

UNTERSUCHUNGEN ZUR DIFFERENZIERUNG DER
ERYTHROZYTEN BEI HÄMATURIE
GLOMERULÄRER UND NICHTGLOMERULÄRER GENESE
NACH FÄRBUNG MIT DIAMINO BENZIDIN

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Mirko Riedl

geboren am 07.04.1968 in Saalfeld/Saale

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung
 - 1.1. Hämaturie und deren Ursachen
 - 1.2. Glomerulonephritis
 - 1.2.1. Pathogenese
 - 1.2.2. Symptome
 - 1.2.2.1. Proteinurie
 - 1.2.2.2. Hämaturie
 - 1.2.2.3. Hypertonie
 - 1.2.3. Diagnostik der Glomerulonephritis
 - 1.2.4. Histopathologische Formen der Glomerulonephritis
 - 1.3. Urologische Erkrankungen – Urolithiasis und Tumoren
 - 1.4. Charakteristika eumorpher und dysmorpher Erythrozytenformen
 - 1.4.1. Mikroskopische Differenzierung der Erythrozytenformen
 - 1.4.2. Entstehung der Hämaturie bei nichtglomerulärer Genese
 - 1.4.3. Pathogenetische Aspekte der Entstehung dysmorpher Erythrozyten
 - 1.4.3.1. Aufbau der Erythrozytenmembran
 - 1.4.3.2. Schädigungsmechanismen der Erythrozyten
 - 1.5. Färbung von Erythrozyten auf der Grundlage der Pseudoperoxidasereaktion mit Diaminobenzidin
 - 1.6. Lichtmikroskopie und Elektronenmikroskopie zur Beurteilung der Erythrozytenformen
2. Problemstellung
3. Material und Methoden
 - 3.1. Untersuchungsgruppen

- 3.2. Reagenzien und Geräte
- 3.3. Herstellung der Spül- und Fixationsgemische zur Reinigung der Urine sowie zur Färbung der Erythrozyten
- 3.4. Lichtmikroskopische Untersuchung der Erythrozyten
 - 3.4.1. Herstellung der Erythrozytendauerpräparate
 - 3.4.2. Beurteilung der Morphologie der Erythrozyten
 - 3.4.3. Meßablauf mit dem Quantimed 500 zur Berechnung der Mittleren Optischen Dichte der Erythrozyten
 - 3.4.4. Berechnung der Mittleren Optischen Dichte
- 3.5. Herstellung der Erythrozytendauerpräparate für die Elektronenmikroskopie
- 3.6. Laborchemische Befunde der Patientengruppen
- 4. Ergebnisse
 - 4.1. Morphologie der Erythrozyten bei Hämaturie
 - 4.1.1. Erythrozyten bei einer nichtglomerulären Hämaturie
 - 4.1.2. Erythrozyten bei einer glomerulären Hämaturie
 - 4.2. Kreisdurchmesser und Mittlere Optische Dichte als spezifische Merkmale der Erythrozyten
 - 4.2.1. Vergleich der Parameter Kreisdurchmesser und Mittlere Optische Dichte der Erythrozyten in den verschiedenen Untersuchungsgruppen
 - 4.2.2. Abhängigkeit der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers der Erythrozyten vom Anteil dysmorpher Erythrozyten im Urinsediment bei glomerulärer Hämaturie
 - 4.2.3. Einfluß von Kreatinin und Harnstoff auf die Mittlere Optische Dichte und den Kreisdurchmesser der Erythrozyten bei glomerulärer Hämaturie
- 5. Diskussion
- 6. Zusammenfassung
- 7. Anhang
- 8. Literaturverzeichnis

1. EINLEITUNG

Im Jahre 1867 veröffentlichte der Anatom Nikolaus Friedreich im Virchows Archiv (31) erstmals Ergebnisse zu Untersuchungen über rote Blutkörperchen bei einer Hämaturie. Er wies darauf hin, daß spezielle Formvarianten der Erythrozyten auf krankhafte Veränderungen der Niere deuten. Die Hämaturie stellt ein wichtiges Leitsymptom bei Erkrankungen der Nieren und ableitenden Harnwege dar.

1.1. HÄMATURIE UND DEREN URSACHEN

In Abhängigkeit des Schweregrades einer Hämaturie ist zwischen einer Mikrohämaturie und einer Makrohämaturie zu unterscheiden. Letztere ist durch eine Rotfärbung des Urins charakterisiert, welche mit bloßem Auge zu erkennen ist.

Die Mikrohämaturie ist durch die Ausscheidung von 5 bis 10 Erythrozyten pro μl Urin gekennzeichnet (109). In der Praxis erfolgt der Nachweis von Erythrozyten im Urin als Screening- Verfahren mittels Teststreifen. Die Methode basiert auf dem Prinzip der Orthotoluidin- bzw. Benzidin- und Peroxidasereaktion (3). Der Test reagiert empfindlicher auf freies Hämoglobin oder Myoglobin als auf intakte Erythrozyten. Bei positivem Ausfall sollte eine mikroskopische Urinuntersuchung erfolgen. Ein erhöhtes spezifisches Gewicht oder erhöhte Eiweißkonzentrationen können die Reaktivität des Testes herabsetzen. Falsch positive Ergebnisse werden durch Reste stark oxidierender Reinigungsmittel, wie z.B. Hypochlorit, oder durch Peroxidasen mikrobiellen Ursprungs, wie beispielsweise bei Harnwegsinfektionen, hervorgerufen. Der Urin sollte spätestens zwei Stunden nach Miktion beurteilt sein.

Wesentlich präzisere Aussagen sind mittels mikroskopischer Beurteilung des Urinsedimentes möglich. Nach Zentrifugation erfolgt die mikroskopische Untersuchung des Urinsedimentes als Ausstrich mit 400-facher Vergrößerung. Neben einer Aussage zur Erythrozytenanzahl, welche pro Gesichtsfeld bestimmt wird, kann bei dieser Untersuchung auch die Form der Zellen beschrieben werden.

Ein einheitlicher Grenzwert, ab dem von einer abklärungsbedürftigen Mikrohämaturie gesprochen wird, ist bisher nicht eindeutig definiert. Er reicht u.a. von einem Erythrozyten pro Gesichtsfeld nach KINDRACHOK et al. über drei Erythrozyten pro Gesichtsfeld nach SPIRNAK bis zu fünf Erythrozyten pro Gesichtsfeld nach KEIL (75, 76, 126).

In Abbildung 1 ist das Schema der mikroskopischen Beurteilung des Urinsedimentes zur Diagnostik einer Mikrohämaturie nach ROTH dargestellt.

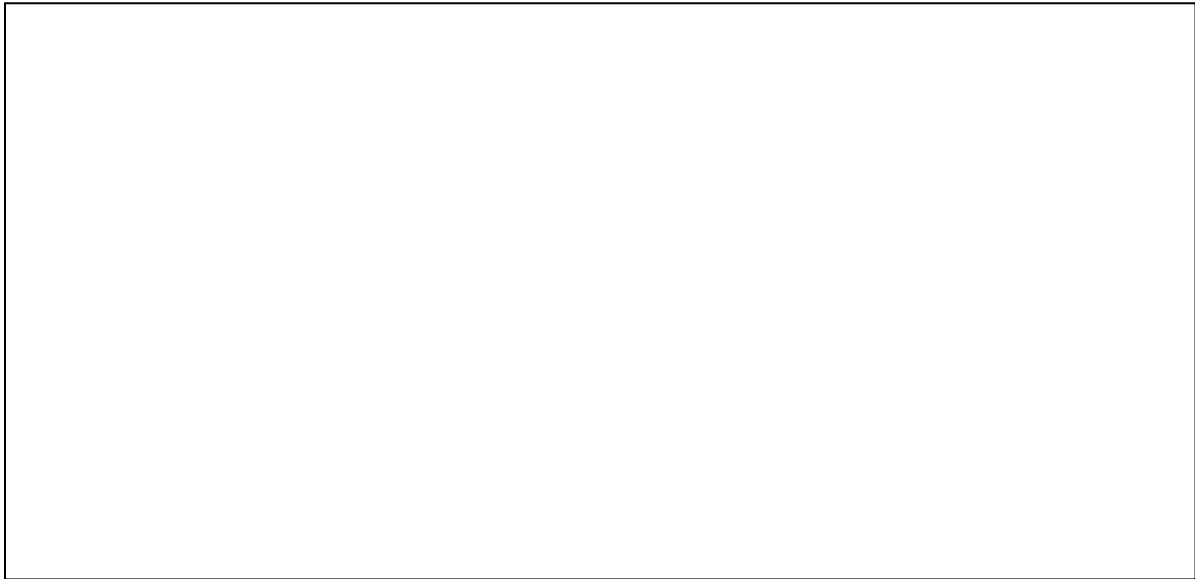


Abbildung 1: Diagnostik der Mikrohämaturie nach ROTH 1991 (109)

Weitere Verfahren zur Beurteilung einer Mikrohämaturie stellen die NEUBAUER-ZÄHLKAMMER, welche erhebliche Normvarianten von 2000 bis 5000 Erythrozyten pro ml Urin aufweist, sowie der ADDIS-COUNT dar. Bei letzterem findet eine Erythrozytenzählung nach zweistündiger Sammelperiode statt. Diese Methode besitzt ebenfalls deutlich variierende Grenzwerte (109). Im STANSFELD-WEBB-Verfahren findet eine Auszählung der Erythrozyten in einer Zählkammer statt. Die Angabe der Zellzahl erfolgt pro μ l Urin.

In jedem Fall einer Makro- oder Mikrohämaturie ist auszuschließen, ob es sich um eine extra-, intra- oder postrenal bedingte Hämaturie handelt. Weiterhin ist festzustellen, ob ein derartiger Befund intermittierend auftritt oder dauerhaft besteht. Differentialdiagnostisch kommen als Ursache einer Hämaturie viele Erkrankungen in Betracht. Zu unterscheiden sind glomeruläre, tubulointerstitielle und hereditäre Ursachen sowie Gefäßprozesse, Traumata, Erkrankungen des Nierenbeckens, der Harnleiter, der Blase, der Prostata, der Urethra sowie systemische Erkrankungen mit Störungen der Thrombozytenfunktion und andere Beeinträchtigungen der Blutgerinnung (33). Selten können Erythrozyten im Urin nach extremer körperlicher Belastung im Sinne einer Marschhämaturie nachgewiesen werden. Mögliche Ursachen einer Hämaturie sind in Tabelle 1 zusammengefaßt.

Für praktisch klinische Belange ist es sinnvoll zu unterscheiden, ob eine Glomerulonephritis, eine Steinerkrankung, ein Tumor oder eine Entzündung im Bereich der ableitenden Harnwege vorliegt (28). Bevor invasive Maßnahmen wie die Zystoskopie, das Ausscheidungsurogramm, die Renovasographie oder die Nierenbiopsie durchgeführt werden, sollten nichtinvasive Verfahren wie die Sonographie und die mikroskopische Beurteilung der Zellen des Urinsedimentes zum Einsatz kommen.

Die Untersuchung des Urinsedimentes im Hellfeld- bzw. Phasenkontrastmikroskop stellt eine wenig aufwendige, nichtinvasive Methode dar, die hilfreich ist, den Ursprung einer Hämaturie einzugrenzen. Dieses einfache und jederzeit wiederholbare Verfahren dient der besseren Planung und Einsetzung weiterführender diagnostischer Maßnahmen im Sinne einer mehr urologischen oder nephrologischen Abklärung (28).

Internistisch-nephrologische Genese	Urologische Genese	Belastungs-hämaturie	Traumatische Genese	Sonstige Formen
Erkrankungen des Nierenparenchyms (z. B. Glomerulo-Nephritis)	Urotheltumoren (Blase, Nierenbecken, Ureteren, Urethra)	Größere Belastungen (z. B. Marathonlauf)	Unfallereignis	Hämo- und Myoglobi-nurie
Systemische Erkrankungen (z. B. Amyloidose, D.m.)	Erkrankungen der Niere (z. B. Nierenzellkarzinom, Zysten)	Orthostase	Postinstrumen-telle Hämaturie (z. B. Zysto-skopie, Biopsien)	Lebensmittel-farbstoffe
Kreislaufferkran-kungen (z. B. Hy-pertonie)	Prostataerkan-nungen (BPH, Adenokarzinom)			Stoffwechsel-produkte
Entzündungen (z.B. bakteriell, viral, parasitär)	Entzündungen (z. B. Blase, Nie-renbecken)			Medikamente
Allergien (z. B. allergische Urothel-reaktionen)	Steinerkrankun-gen (z. B. Nie-renbecken, Harn-leiter, Blase)			Hämospermie
Blutgerinnungsstö-rungen	Gefäßerkran-kungen (z. B. Nierenvenen-thrombose)			Menstruation und vaginale Hämorrhagie

Tabelle 1: Ursachen der Hämaturie und mögliche Differenzialdiagnosen nach ROTH (109)

1.2. GLOMERULONEPHRITIS

1.2.1. PATHOGENESE

Die Glomerulonephritis kennzeichnet eine abakterielle symmetrische Entzündung glomerulärer Strukturen, die sich als Folge einer Immunreaktion nach Ablagerung von Antigen-Antikörper-Komplexen an der glomerulären Basalmembran entwickelt. Formal pathogenetisch zählt sie zum Kreis der Überempfindlichkeitsreaktionen (104).

Eine Auflistung endogener sowie exogener Antigene, die zur Entstehung der Glomerulonephritis beitragen oder führen können, ist in Tabelle 2 wiedergegeben.

Aus histopathologischer Sicht werden nach RIEDE (104) folgende Grundtypen unterschieden:

1. Antibasalmembran-Antikörpernephritis

Eine besondere Rolle bei der Entstehung dieser Antigen-Antikörper-Reaktionen spielt das TYP-IV-Kollagen. Dieses Strukturprotein ist ein wesentlicher Bestandteil aller Gefäßbasalmembranen. Der C-Terminus des TYP-IV-Kollagens weist nicht die kollagentypische Aminosäuresequenz auf. Deshalb wird dieser Abschnitt hierbei auch als nicht-kollagene Domäne bzw. NC-Domäne bezeichnet; sie stellt das Autoantigen der Anti-GBM-Autoantikörper in der Gefäßbasalmembran dar (144). Verschiedene Arbeitsgruppen konnten zeigen, daß Anti-GBM-Antikörper in dieser NC-Domäne reagieren (18, 78, 79, 145, 146). Mit der Identifizierung von vier neuen spezifischen α (IV)-Ketten des TYP-IV-Kollagens konnte geklärt werden, weshalb nicht eine generelle Vaskulitis hervorgerufen wird. Es ließ sich zeigen, daß das Epitop der Anti-GBM-Antikörper auf der α 3(IV)-Kette des TYP-IV Kollagens vorkommt (144). Diese α 3(IV)-Kette findet sich lediglich in den Basalmembranen der Lungenalveoli, der Nierenglomeruli und einigen anderen Basalmembranen. Die eingeschränkte Expression der α 3(IV)-Kette dürfte somit den bevorzugten Befall von Lunge und Niere bei der Anti-GBM-Antikörpererkrankung erklären (79, 142, 146).

Die Antikörper werden an der glomerulären Basalmembran fixiert, welches wiederum eine leukotoxische Schlingenschädigung bewirkt. Die folgende Antigen-Antikörper-Reaktion findet unter Komplementaktivierung an der Innenseite der Basalmembran statt, es entsteht eine Glomerulonephritis.

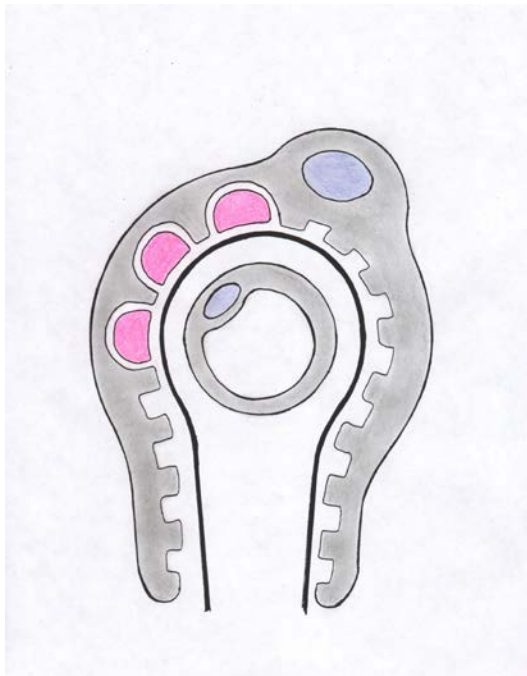
Immunhistologisch ist bei diesen Formen ist ein lineares Fluoreszenzmuster erkennbar, welches durch die gleichmäßigen Ablagerungen von IgG, seltener auch von IgM, entlang der glomerulären Basalmembran hervorgerufen wird. Dieser Antibasalmembrantyp einer Glomerulonephritis ist relativ selten, er umfaßt ca. 3 bis 5 % aller Erkrankungsfälle.

2. Immunkomplexnephritis

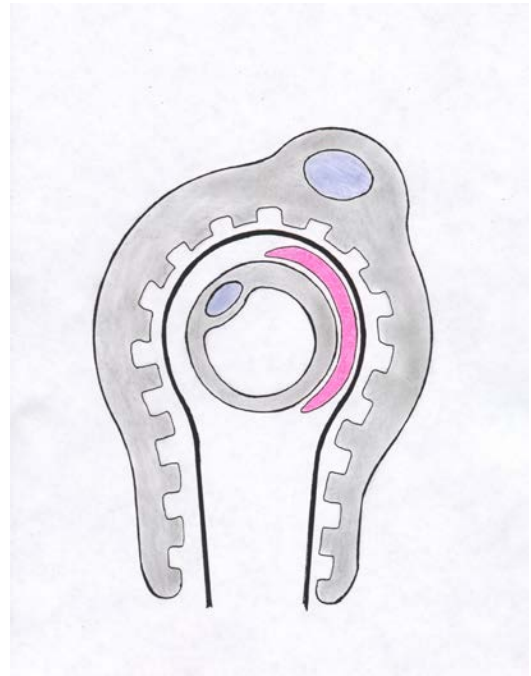
Exogene und endogene Antigene, wie sie in Tabelle 2 zusammengefaßt wurden, sind in der Lage, die Bildung von Antikörpern zu induzieren. Die entstehenden Antigen-Antikörper-Komplexe können in den glomerulären Kapillaren abgelagert werden. Die Folge sind Entzündungsvorgänge.

Bei zahlreichen Glomerulopathien ist das auslösende Antigen nicht bekannt. Stark kationische Immunkomplexe werden subepithelial als sogenannte „humps“ abgelagert, siehe Abbildung 2 a. Bei stark anionischen Komplexen findet die Einlagerung subendothelial, siehe Abbildung 2 b, und bei ladungsneutralen Immunkomplexen mesangial statt, siehe Abbildung 2 c. Weiterhin ist die Lokalisation der Ablagerungen auch von der Größe der Immunkomplexe abhängig. Große Komplexe liegen subendothelial oder mesangial, kleine Komplexe auf der Außenseite der Basalmembran (104).

Elektronenmikroskopisch geben sichtbare Depots, die immunfluoreszenzmikroskopisch granulären Ablagerungen entsprechen, Hinweise auf eine Immunkomplexgenese. Dieser Typ der Glomerulonephritis wird bei etwa 95 % aller Erkrankungsfälle gefunden (16, 104).



a)



b)

Abbildung 2: Immunkomplexablagerung a) subepithelial und b) unmittelbar subendothelial nach Wehner/Riede/Freudenberg (104)

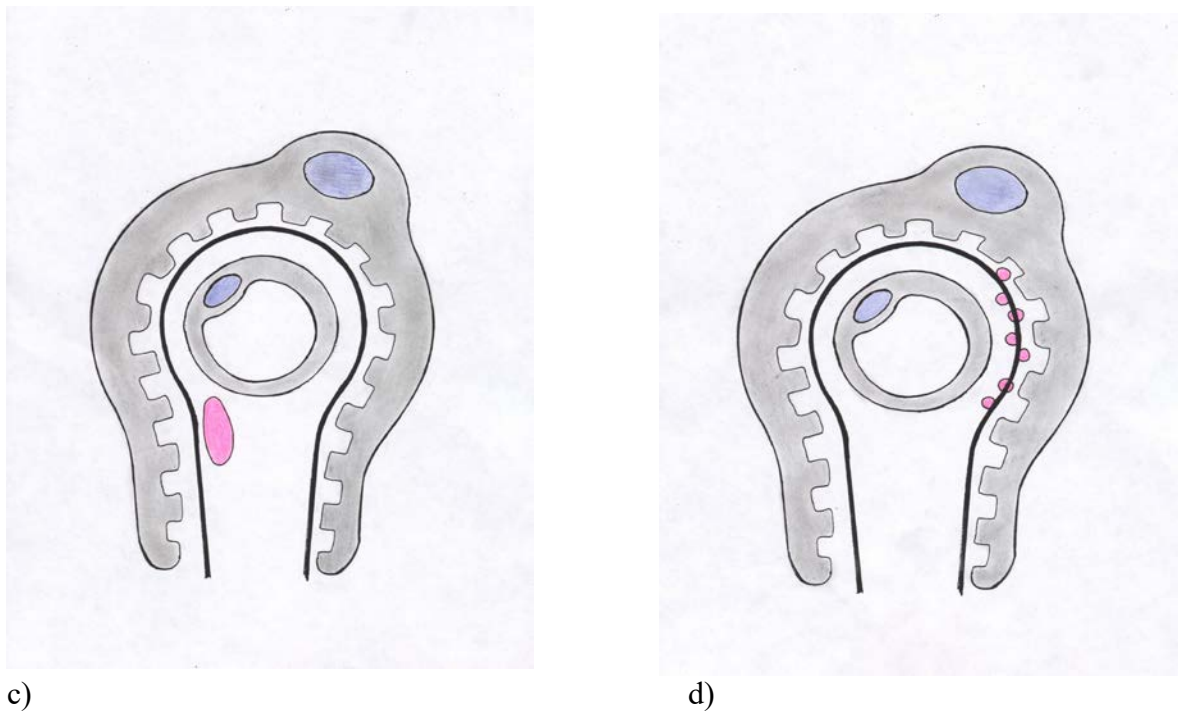


Abbildung 2: Immunkomplexablagerung c) mesangial und d) im Bereich der Lamina rara externa nach Wehner/Riede/Freudenberg (104)

Nach der Ablagerung zirkulierender Immunkomplexe bzw. der Reaktion von Basalmembranantikörpern mit der $\alpha 3$ -Kette des Typ-IV-Kollagens werden entzündliche Veränderungen durch verschiedene Mediatorsysteme ausgelöst und unterhalten. Durch die Aktivierung neutrophiler Granulozyten erfolgt die proteolytische und toxische Zellschädigung, durch Entzündungsmediatoren wie Prostaglandine, saure und neutrale Proteasen sowie Zytokine, welche bei der zellvermittelten Reaktion aus den Makrophagen und Mesangiumzellen freigesetzt werden. Adhäsionsmoleküle wie Selektin und Integrin ermöglichen das Festsetzen der Granulozyten und Makrophagen in den glomerulären Kapillaren. Durch Entzündungsmediatoren wie Tumornekrosefaktoren, Leukotriene, Komplementfaktoren und plättchenaktivierende Faktoren erfolgt die Chemotaxis und Adhäsion von Phagozyten an glomerulären Zellen. Durch die Zytokine Tumornekrosefaktor- α -2, Interleukin-1- β , Interferon- γ werden die Endothelzellen zur Bildung von IgG-ähnlichen Molekülen stimuliert, die wiederum als Bindungsstellen für Leukozyten dienen. Die Aktivierung der Komplementkaskade bewirkt die Einlagerung von Granulozyten und Makrophagen und somit fortschreitende Entzündungsvorgänge in den Glomeruli; durch den "membrane attack complex C5b-9" erfolgt eine Alteration der Zellmembran. Weitere Entzündungsmediatoren sind Metaboliten der Arachidonsäure, wobei das Leukotrien-B4 als chemotaktischer Faktor für die Granulozyten dient. Das Tromboxan-A2, welches durch aktivierte glomeruläre Zellen produziert wird, fördert die Thrombozytenaggregation (22, 84).

Nach O'REGAN et al. (26) können u.a. folgende exogene und endogene Antigene bei der Entstehung einer Glomerulonephritis eine Rolle spielen:

Endogene Antigene	Exogene Antigene
Desoxyribonucleinsäure (bei Lupus erythematodes)	Bakterien: z. B. Streptokokken, Staphylokokken, Pneumokokken, Salmonella typhi
Renales Tubulusepithelantigen (z. B. bei Sichelzellenanämie und Fanconi-Syndrom)	Viren: z. B. Coxsackie-B-Antigen, Virushepatitisantigen, Masernantigen, Epstein-Barr-Virusantigen
Schilddrüsenantigen (bei Autoimmun-Thyreoiditis)	Parasiten: z. B. Plasmodium malariae, Schistosoma mansoni, Toxoplasma gondii
α-1-Antitrypsin-Globulin	Tumorantigen, Melanomantigen
Tumorantigen (z. B. karzinoembryonales Antigen) und Melanomantigene	Pilze: z. B. Candida albicans
	Medikamente: z. B. Penicillamin, Gold, Quecksilber, Trimethadion, Captopril, Probenecid

Tabelle 2: Ausgewählte Ursachen für die Entstehung einer Glomerulonephritis nach O'REGAN (26)

Durch die geschilderten Vorgänge kommt es zu strukturellen Veränderungen am Mesangium, am Schlingenkonvolut, an der glomerulären Basalmembran und am Epithel der Bowmanschen Kapsel, siehe Tabelle 3. Die Folge ist eine erhöhte Permeabilität der Basalmembran.

GENESE	GEWEBSVERÄNDERUNGEN
Einlagerungen von Ag-Ak-Komplexen in glomerulären Zellen	Zellproliferation
	Vermehrung der mesangialen Matrix
	Schlingenadhäsionen
	Lobulierung der Schlingen
Aktivierung von Entzündungs-Reaktionen	Kapselsynechien
	Entstehung epitheloider Zellkomplexe

Tabelle 3: Ursachen und Formen der Gewebsschädigung bei Glomerulonephritiden nach Bohle, Grabensee, Natusch und Remmele (13, 45, 94, 103)

1.2.2. SYMPTOME

Die Kardinalsymptome einer Glomerulonephritis sind Proteinurie, Erythrozyturie sowie die Hypertonie.

1.2.2.1. PROTEINURIE

Eine Eiweißausscheidung bis 150 mg im Zeitraum von 24 Stunden wird noch als physiologisch angesehen (76). Der Übertritt von Proteinen mit einem Molekulargewicht von mehr als 70 kD durch die glomeruläre Basalmembran wird durch die Kombination einer mechanischen und elektrostatischen Siebfunktion verhindert. Die Feinstruktur der Basalmembran beruht auf einem supramolekularen Maschenwerk aus spezifischem Kollagen TYP-IV. Diesem sind polyanionische Heparansulfatproteoglykangruppen aufgelagert, welche die elektrostatische Abstoßung negativ geladener Serumproteine bewirken. Die Integrität des dichten Kollagennetzes dürfte für die Filtrationseigenschaft der glomerulären Basalmembran wesentlich sein (71, 143, 146). Bei einem Molekulargewicht kleiner 66 D, welches dem des Albumins entspricht, gelangen die Eiweiße ungehindert in den Primärurin. Durch Pinozitose erfolgt die Aufnahme von Eiweißmolekülen in die Tubulusepithelzelle im Bereich der proximalen Tubuli. Hier werden sie lysosomal abgebaut und katabolisiert. Proteine mit einem Durchmesser größer als 70 KD können normalerweise das glomeruläre Filter nicht passieren. Die genannten Mechanismen wirken in der gesunden Niere einem größeren Eiweißverlust entgegen. Eine Auflistung einiger Proteinmoleküle mit Angabe der Molekulargewichte erfolgt in Tabelle 4.

Molekulargewicht	Proteinfraktion
11 kD bis 68 kD	β-2-Mikroglobulin Lysozym Monomeres Hämoglobin retinolbindendes Protein Monomere Leichtketten Apolipoprotein A 1 α-1-Mikroglobulin
69 kD bis 315 kD	Albumin Transferrin Dimeres Albumin Monomere Immunglobuline Dimere Immunglobuline

Tabelle 4: Einteilung der Proteinfraktionen entsprechend dem Molekulargewicht nach Boesken (10)

Bei der Proteinurie wird zwischen einer renalen und einer postrenalen Form unterschieden. Im Rahmen einer Glomerulonephritis treten an der Basalmembran morphologische Veränderungen auf. Folgen sind u.a. Defekte und Rupturen sowie vergrößerte Porendurchmesser der Membran. Glomeruläre Entzündungsprozesse bewirken durch die Zerstörung des TYP-IV Kollagenmaschenwerkes Veränderungen der Membranpotentiale. Es kommt zum Verlust

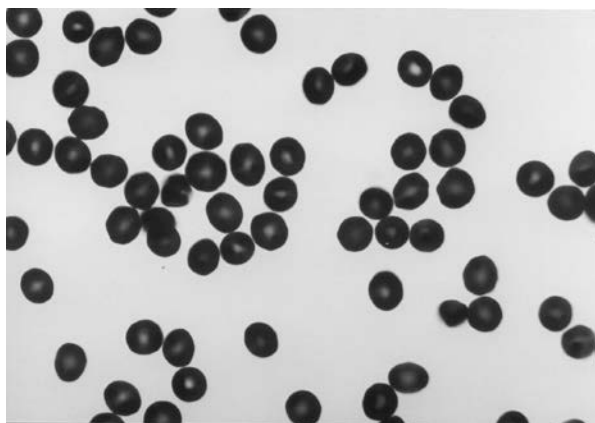
anionischer Ladungen auf der Lamina externa rara, was wiederum der Abstoßung negativ geladener Serumproteine entgegenwirkt. Proteine mit einem Molekulargewicht über 70 kD wie beispielsweise Transferrin und Immunglobulin gelangen dann auch in den Primärurin. Bei intakter tubulärer Funktion werden die kleineren Proteine wie z.B. Alpha-1- und Beta-2-Mikroglobulin reabsorbiert, aber Albumin, Transferrin und Immunglobuline im Sekundärurin ausgeschieden. Bei Schädigung des tubulären Apparates wie beispielsweise bei einer interstitiellen Nephritis, aber auch bei sekundärer Schädigung im Rahmen einer Glomerulonephritis, sind die Epithelzellen der proximalen Tubuli nicht in ausreichendem Maße in der Lage, die filtrierten, kleinmolekularen Proteine zu reabsorbieren. Alpha-1-Mikroglobulin, retinolbindendes Protein, Immunglobulinleichtketten, monomeres Hämoglobin, Lysozym und Beta-2-Mikroglobulin sind dann im Sekundärurin enthalten.

Von einer selektiven glomerulären Proteinurie spricht man, wenn im Urin Transferrin nachweisbar ist, jedoch die größeren Immunglobuline die Basalmembran nicht passieren können. Werden zusätzlich zu Albumin und Transferrin Immunglobuline ausgeschieden, handelt es sich um eine unselektive Proteinurie.

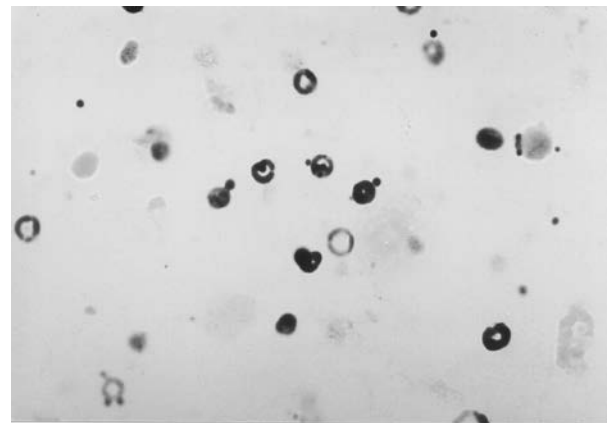
Sonderformen der Proteinurie bilden die sogenannte Überlaufproteinurie, die lokale Sekretion von Immunglobulinen im harnableitenden System bei Harnwegsinfekten und die postrenale Blutbeimengung im Urin. Die Überlaufproteinurie wird auch als prärenale Proteinurie bezeichnet. Der Serumwert eines bestimmten Proteins ist überschritten. Nach Passage dieser Moleküle durch das glomeruläre Filter wird die tubuläre Reabsorptionsfähigkeit überlastet. Eine Eiweißausscheidung von mehr als 3 g innerhalb von 24 Stunden ist möglich. Die Myoglobinurie, die Bence-Jones-Proteinurie, die Amylaseausscheidung bei akuter Pankreatitis sowie Lysozyme bei Leukämie stellen Beispiele für diese Art der Proteinurie dar.

1.2.2.2. HÄMATURIE

Typisch für eine glomeruläre Erkrankung sind Erythrozytenzyylinder sowie dysmorphe Erythrozyten, insbesondere Akanthozyten. Diese Zellen sind im Vergleich zu denen bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese durch Formveränderungen, Hämoglobinverarmung und Membranfaltungen charakterisiert, siehe auch Abbildung 3 (138).



a)



b)

Abbildung 3: a) eumorphe Erythrozyten bei nichtglomerulär bedingter Hämaturie und
b) dysmorphe Erythrozyten bei glomerulärer Hämaturie

1.2.2.3. HYPERTONIE

Die Häufigkeit einer Hypertonie steigt mit der Zunahme der Niereninsuffizienz. Sie beträgt im Terminalstadium der Erkrankung 90 % (129). Unterschieden wird zwischen

- renoparenchymatöser und
- renovaskulärer Hypertonie.

Bei parenchymatösen Nierenerkrankungen ist die Natriumretention mit Verschiebung der Druck-Natrium-Beziehung für das Entstehen einer Hypertonie ursächlich. Nach TIEDT (140) kann dies besonders ausgeprägt bei der IgA-Glomerulonephritis und der membranproliferativen Glomerulonephritis beobachtet werden. Es wird weiterhin vermutet, daß bei diffusen parenchymatösen Nierenerkrankungen das Renin-Angiotensin-System eine vasopressorische Rolle spielt (111).

Bei einer Nierenarterienstenose vom atherosklerotischen Typ bzw. bei einer fibromuskulären Dysplasie erfolgt eine gestörte Regulation der Reninabgabe, die eine gesteigerte intrarenale und extrarenale Angiotensin-2-Ansprechbarkeit und damit die Entstehung einer Hypertonie bewirkt.

1.2.3. DIAGNOSTIK DER GLOMERULONEPHRITIS

Neben anamnestischen Angaben und dem klinischen Befund sind laborchemische Untersuchungen zur Erfassung einer Glomerulonephritis wichtig. Diese beinhalten Bestimmungen der harnpflichtigen Substanzen, der Elektrolyte, insbesondere des Kaliums und des Natriums, sowie des Gesamteiweißes. Weiterhin sind Analysen des Blutbildes, der Blutkörperchensenkung, des Blutzuckers und der Gerinnungsparameter erforderlich. Es ist möglich, daß durch den renalen Verlust von Transportproteinen Erniedrigungen der Serumwerte von 25(OH)-Vitamin D₃, Eisen, Thyroxin, Kupfer und Vitamin B₁₂ auftreten. Pathologische Veränderungen der Immunglobuline können Ausdruck eines Immunregulationsdefektes sein. Bakteriologische und parasitologische Erkrankungen müssen ausgeschlossen werden. Die Niere dient sowohl als Bildungsstätte von Hormonen als auch als deren Zielorgan. Bei chronischer Niereninsuffizienz sind eine Vielzahl pathophysiologischer Regulationsstörungen nachweisbar, so daß eine Hormonanalyse wichtig ist. Besondere Bedeutung haben das Renin und das 1,25-Dihydroxycholecalciferol. Der renale erythropoetische Faktor wird in der Niere bei Hypoxämie gebildet und bewirkt die Synthese von Erythropoetin. Aldosteron, Antidiuretisches Hormon und Parathormon stellen Substanzen dar, welche die Niere als hormonelles Zielorgan beeinflussen und somit den Wasser-, Elektrolyt- und Substrattransport bestimmen (128).

Eine Untersuchung des Urins ist zwingend notwendig. Neben der Feststellung einer Erythrozyturie und deren Differenzierung ist die qualitative und quantitative Untersuchung von Proteinen hilfreich, um den renoparenchymatösen Ursprung einer Erkrankung weiter einzugrenzen. Als Marker für eine glomeruläre Proteinurie dienen die Ausscheidung von Immunglobulinen und Albumin, für tubuläre Störungen die Exkretion von α 1-Mikroglobulin und für postrenale Beimengungen die von α 2-Makroglobulin (65). Als Indikator der Selektivität des glomerulären Filters dient das IgG (34).

Um eine Glomerulonephritis als Begleiterkrankung bei Systemkrankheiten auszuschließen, sollen antinukleäre Faktoren sowie der Doppelstrang(ds)-DNS-Antikörper als Hinweise auf einen systemischen Lupus erythematodes bestimmt werden.

Weiterhin erfolgt die Bestimmung von Antikörpern gegen zytoplasmatisches Antigen der Leukozyten - ANCA - zur Ausschließung einer Wegenerschen Granulomatose bzw. einer mikroskopischen Polyarteriitis. Ein Nachweis von Antikörpern gegen die glomeruläre Basalmembran wird bei 90 % der Patienten mit Goodpasture Syndrom bzw. in etwa 5 % der Fälle mit rasch progredienter Glomerulonephritis ohne pulmonale Manifestation gefunden. Bei der Purpura Schoenlein-Henoch ist eine perivaskuläre Ablagerung von IgA, bei anderen Formen der Vaskulitis von IgG und Komplementfaktoren vorhanden.

Infizierte Ekzeme und Impetigo können Ursachen für eine Poststreptokokkenglomerulonephritis darstellen. Eine Tonsillitis bzw. Pharyngitis gibt Hinweise auf das Vorhandensein einer IgA-Glomerulonephritis oder Poststreptokokkenglomerulonephritis.

Bildgebende Untersuchungen umfassen hauptsächlich die Nierensonographie, bei der beidseits gleich vergrößerte Nieren mit verbreitertem echoarmen Parenchymsaum und echoleeren Papillen nachgewiesen werden können. Das Röntgen-Thoraxbild kann Hinweise auf ein Goodpasture Syndrom sowie auf eine Wegenersche Granulomatose geben. Ein Befall des Interstitiums wird oft bei der Purpura Schoenlein-Henoch und der Polyarteriitis nodosa beobachtet. Bei letzterer sollte, falls eine klinische Symptomatik besteht, eine abdominelle Angiographie in Erwägung gezogen werden, um Aneurysmata auszuschließen (128).

All diese Untersuchungen gestatten allerdings nur bedingt Rückschlüsse auf die Art der glomerulären histologischen Veränderungen. Zur morphologischen Klassifizierung der Glomerulonephritis und den sich daraus ableitenden Therapieschemata ist die Nierenbiopsie mit der lichtmikroskopischen, immunhistologischen sowie elektronenmikroskopischen Beurteilung des Gewebes unerlässlich, siehe auch Abschnitt 1.2.4..

Indikation für Nierenbiopsie	Kontraindikation zur Nierenbiopsie
- wenn klinische, biochemische oder nuklearmedizinische Untersuchungen zur Klärung der Diagnose nicht genügen und therapeutische Maßnahmen vom morphologischen Befund abhängig sind	- Gerinnungsstörungen - Zystennieren - Gefäßanomalien wie Aneurysmen der Nierenarterie - Perinephritis oder Nierentumor - Hydro- oder Pyonephrose - schwere Hypertonie - ausgeprägte Nephrokalzinose sowie - unkooperative Patienten.

Tabelle 5: Indikationen und Kontraindikationen zur Nierenbiopsie (34, 128, 129)

1.2.4. HISTOPATHOLOGISCHE FORMEN DER GLOMERULONEPHRITIS

Entsprechend einer Einteilung von STEIN et al. (129) werden folgende Formen einer Glomerulonephritis unterschieden:

I. Glomerulonephritis mit einem nephrotischen Syndrom, die häufigsten Formen stellen dabei die

- Minimal-Change-Glomerulopathie
- Fokal Segmentale Glomerulosklerose
- Extramembranöse Glomerulonephritis
- Membranoproliferative Glomerulonephritis
- Proliferative Glomerulonephritis
- Mesangiale IgA-Glomerulonephritis (Morbus Berger) dar.

Sonderformen sind die

- Glomerulonephritis als Begleiterkrankung bei Systemkrankheiten wie z.B. Systemischer Lupus erythematoses, Schönlein-Henochsche Purpura, Periarteriitis nodosa, Goodpasture-Syndrom oder Wegenersche Granulomatose.
- Glomerulonephritis bei extrarenaler Primärerkrankung, z.B. Sarkoidose,
- Glomerulonephritis als Begleiterkrankung bei chronischen, bakteriellen oder mikrobiellen Infektionen, z.B. Hepatitis B oder Malaria,
- Paraneoplastische Glomerulonephritis,
- Glomerulonephritis bei Medikamentenüberempfindlichkeit.

II. Glomerulonephritiden bei nephritischem Syndrom

a) Glomerulonephritiden

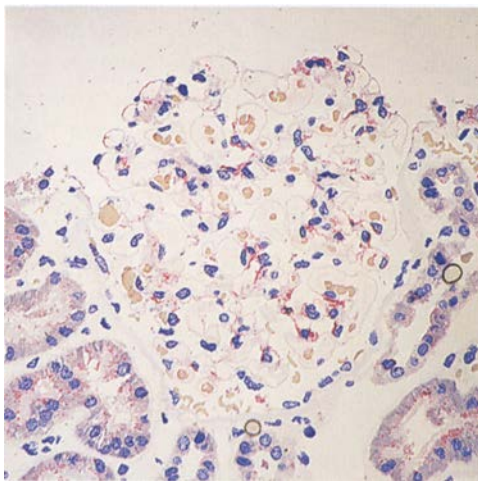
- Akute Poststreptokokken-Glomerulonephritis,
- Rasch progrediente Glomerulonephritis,
- Membranoproliferative Glomerulonephritis, Typ I und II,
- IgA-Nephropathie (Morbus Berger),
- Familiäre Glomerulonephritis (Alport-Syndrom)

b) Glomerulonephritis im Rahmen von Systemkrankheiten

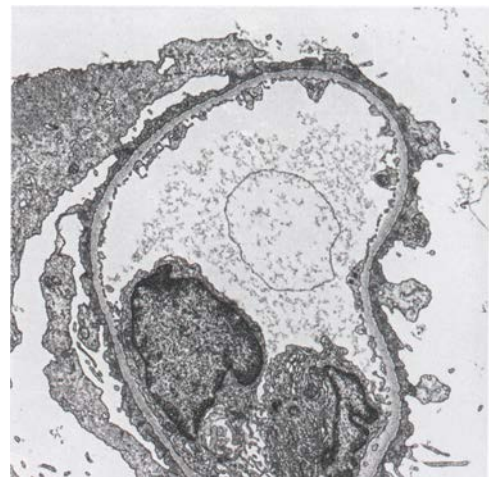
- Systemischer Lupus erythematoses
- Purpura Schönlein Henoch,
- Goodpasture-Syndrom,
- Wegenersche Granulomatose,
- Polychondritis mit Glomerulonephritis,
- Periarteriitis nodosa und andere Angiitis-Formen (129).

1. Minimal-Change-Glomerulopathie

Diese Erkrankung ist die häufigste Ursache des nephrotischen Syndroms im Kindesalter. Bei Erwachsenen tritt sie bei etwa 20 % aller Patienten mit nephrotischem Syndrom auf (133). Pathogenetisch wird eine Schädigung der glomerulären Epithelzellen durch nephrotoxische Zytokine vermutet. Diese bewirken wiederum eine Abnahme der Elektronegativität der glomerulären Kapillarwand, welche für das Auftreten der Albuminurie verantwortlich ist. Der lichtmikroskopische Befund ist unauffällig, selten sind geringgradige IgG- und IgM-Ablagerungen nachweisbar. Im Elektronenmikroskop können Verschmelzungen von Podozyten nachgewiesen werden. In den Abbildungen 4 a und 4 b ist ein typischer Befund dargestellt.



a)



b)

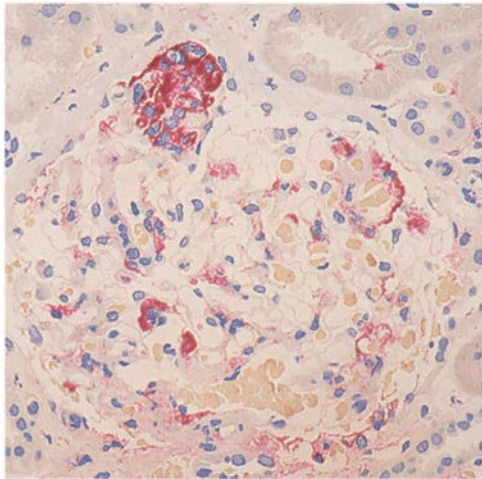
Abbildung 4: immunhistologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen bei Glomerulonephritis nach BRASS (16)

- a) immunhistologischer Nachweis unspezifischer Ablagerung von IgM
- b) glomeruläre Kapillaren mit diffusem Verlust der Fußfortsätze

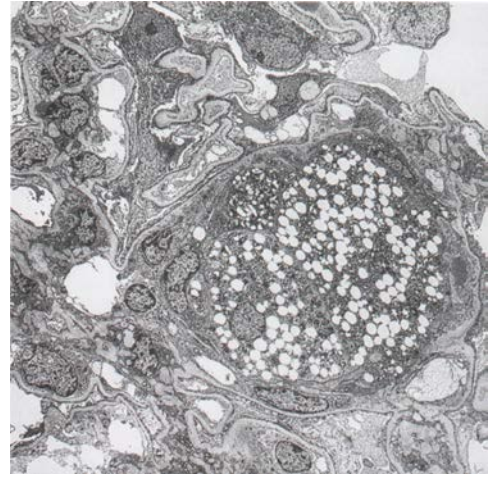
2. Fokal Segmentale Glomerulosklerose

Die primäre idiopathische Form dieser Erkrankung stellt die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms im Erwachsenen- und im Kindesalter dar. Differenzialdiagnostisch muß an die sekundäre Form dieser Erkrankung, insbesondere bei HIV-Infektionen und Heroinabusus, gedacht werden. Die Pathogenese ist unklar, es wird an eine zytokinbedingte Schädigung der Epithelzellen im Bereich des Glomerulums gedacht, welches wiederum die Permeabilität der glomerulären Kapillarwand, insbesondere für Albumin, erhöht. Die fokal-segmentale Glomerulosklerose ist meist durch eine in den juxtamedulären Glomeruli beginnende Verödung einzelner Glomerulusschlingen und einer Sklerosierung des Mesangiums gekennzeichnet.

Immunfluoreszenzmikroskopisch sind in den verödeten Mesangiumbezirken IgM-Ablagerungen und C 3 nachweisbar, siehe auch Abbildungen 5 a und 5 b.



a)



b)

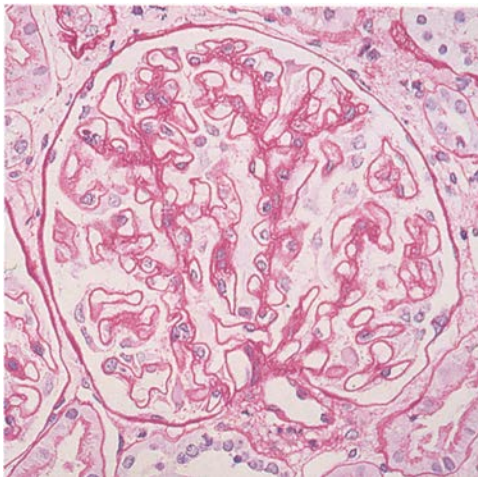
Abbildung 5: immunhistologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen bei Glomerulonephritis nach BRASS (16)

a) innerhalb der Schlingenverdickung abgelagertes IgM

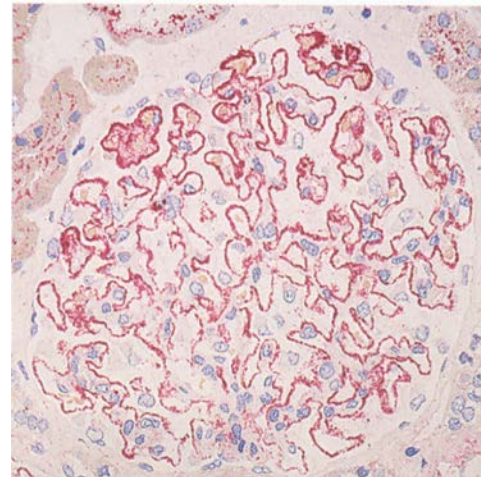
b) Schaumzelle mit vakuolisierten lysosomenreichen Zytoplasma

3. Membranöse Glomerulopathie

Die Membranöse Glomerulopathie ist die häufigste Ursache eines nephrotischen Syndroms im Erwachsenenalter. Bei Kindern wird dieses Krankheitsbild selten diagnostiziert. Gekennzeichnet ist diese Erkrankung durch Immunkomplexablagerungen an der Außenseite der Basalmembran. Das auslösende Antigen zur Bildung dieser Immunkomplexe ist unbekannt, gehäuftes Auftreten membranöser Glomerulopathien bei Patienten mit HLA-DR3 deutet auf eine genetische Disposition hin. Durch elektronenmikroskopische und immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen können die subepithelialen Lokalisationen der Ablagerungen nachgewiesen werden, siehe Abbildung 6 a und 6 b.



a)



b)

Abbildung 6: lichtmikroskopische und immunhistologische Untersuchungen bei Glomerulonephritis nach BRASS (16)

- a) Glomerulus mit gleichförmig verbreiterten Kapillarwänden
- b) immunhistologisch feingranulierte Ablagerungen von IgG entlang der Kapillarwände

4. Membranoproliferative Glomerulonephritis

Diese Form stellt selten die Ursache eines nephrotischen Syndroms dar. Typ 1 und Typ 3 entsprechen vermutlich einer Immunkomplexnephritis. Beim Typ 2 ist im Serum häufig der C 3-Nephritisfaktor nachweisbar, der für die Aktivierung der Komplementkaskade beschädigt ist. Die membranoproliferative Glomerulonephritis findet man bei angeborenem Mangel der Komplementfaktoren C1 und C2, beim C1-Inhibitormangel sowie bei totaler und partieller Lipodystrophie. Diese Form ist durch eine Doppelkonturierung der Basalmembran, d.h. Aufspaltung bei der Silberfärbung, und durch seine zelluläre Proliferation im Mesangium gekennzeichnet. Dem lichtmikroskopischen Befund entsprechen zwei Varianten, zum einen Typ I mit subendothelialen, zum anderen Typ II mit hyalinen Depots innerhalb der glomerulären und tubulären Basalmembran. Das Ablagerungsmuster ist schematisch in Abbildung 2 d dargestellt. Der Nachweis eines C3-Nephritis-Faktors C3NeF ist beweisend für das Bestehen einer membranoproliferativen Glomerulonephritis.

5. Die IgA-Nephropathie

Die IgA-Nephropathie ist mit 15 bis 40 % die häufigste Form der idiopathischen Glomerulonephritis. Die Pathogenese ist weitgehend ungeklärt. Eine Hyperreagibilität des IgA-Systems auf eine antigene Stimuli wird vermutet. Weiterhin weisen abnorme IgA-Komplexierungsmuster und eine abnorme Glykosilierung des IgA-Moleküls daraufhin, daß durch die abgelagerten IgA- bzw. IgA-Immunkomplexe eine Stimulation der glomerulären

Mesangialzellen und somit eine gesteigerte Proliferation durch die Induktion von Wachstumsfaktoren und Zytokin stattfindet. Der immunfluoreszenz-optische Nachweis von IgA im Mesangium, seltener in der subendothelialen Region, ist beweisend für diese Form der Erkrankung. Oft ist der C 3-Komplementfaktor nachweisbar. Die lichtmikroskopischen Befunde variieren stark.

6. Rasch progrediente Glomerulonephritis

Die rasch progrediente Glomerulonephritis ist histopathologisch meistens eine extrakapilläre Glomerulonephritis. Im Lichtmikroskop ist eine erhebliche Verdickung der Bowmanschen Kapsel kennzeichnendes Merkmal. Diese entsteht zunächst durch Proliferation der parietalen Epithelzellen, welche dann basalmembranartiges Material bilden. Später kommt es in zunehmendem Maße zur Kollagenfaserbildung. Immunfluoreszenzmikroskopisch zeigt sich beim Typ I der Anti-Basalmembran-Antikörper-Typ mit einem linearen Ablagerungsmuster von IgG und C3, beim Typ II ein Immunkomplextyp mit einem periphergranulären Ablagerungsmuster von IgG und C3. Beim Typ III sind keine Immundepots nachweisbar. Durch die elektronenmikroskopische Untersuchung finden sich rupturierte Glomerulusschlingen, der Kapselraum ist mit Fibrin gefüllt.

1.3. UROLOGISCHE ERKRANKUNGEN – UROLITHIASIS UND TUMOREN

Makrohämaturien bzw. Mikrohämaturien treten gehäuft auch bei urologischen Erkrankungen auf. Eine bedeutende Rolle spielen hierbei die Urolithiasis und Nierenzysten sowie die Tumoren der Nieren und/oder ableitenden Harnwege und der männlichen Geschlechtsorgane.

1. Urolithiasis

Die Prävalenz des Harnsteinleidens beträgt in den Industriestaaten 4 bis 10 % (62). Männer erkranken zwei- bis viermal häufiger als Frauen mit einem Häufigkeitsgipfel um das 35. Lebensjahr. Der Harnstein ist als eine Manifestation einer übergeordneten System- oder Grundkrankheit aufzufassen. Die Entstehung beruht auf einem multifaktoriellen Geschehen, wobei nur ein Teil der Ursachen bisher bekannt sind (2). Neben den geographischen, klimatischen und rassischen Faktoren spielen insbesondere Änderungen der Ernährung, Verschiebungen der Harnzusammensetzung und -reaktion sowie Harnwegsinfektionen und Stauung eine bedeutende Rolle. Krankheiten, bei denen die Bildung kalziumhaltiger Steine häufig ist, sind der primäre Hyperparathyreoidismus, die normokalzämische Hyperkalziurie, Neoplasien, Sarkoidosen, Hyperoxalurien, renale tubuläre Azidosen, die Gicht und Zystinurien. Weiterhin sorgen Immobilisation und Vitamin-D-Überdosierung für eine Hyperkalziurie, welche die Steinbildung begünstigt (2, 68).

Harnsteine bestehen aus einer kristallinen anorganischen Substanz, die das Hauptgewicht eines Steines darstellt, und einer Steinmatrix - einem organischen Netzwerk. Sie können aus einer Vielzahl verschiedener Substanzen bestehen. Makroskopisch unterscheiden sich die Steine nach Farbe, Härte und Bruchart.

Sie werden in folgende Gruppen unterteilt:

- Kalziumsteine wie Oxalatmonohydrat- und Oxalatdihydrat- bzw. Whewellit - und Weddellitsteine, sie stellen mit ca.60% die Hauptgruppe der Steinerkrankungen dar;
- Phosphatsteine, welche in ca.10% der Fälle vorhanden sind, werden in Hydroxylapatit- und Carbonatapatitsteine differenziert;
- kalziumfreie Steine, sie werden in die Harnsäuresteine, ca.20%, die Struvitsteine, ca.10%, und die Zystinsteine, ca.0,5-1%, unterschieden (2).

Von einer idiopathischen Nephrolithiasis wird gesprochen, wenn Krankheiten mit häufiger kalziumhaltiger Steinbildung ausgeschlossen werden können. Dies betrifft zwei Drittel aller Patienten mit kalziumhaltigen Steinen (2).

Die klinische Symptomatik bei einer Urolithiasis ist von der Lage und Beweglichkeit der Konkreme abhängig. Parenchymsteine sind meist symptomlos, ruhende Steine in den Kelchen oder im Nierenbecken rufen nur geringe Beschwerden im Sinne eines unbestimmten Druckgefhls in der Flanke hervor. Zum Auftreten einer Nierenkolik kommt es beim bertritt eines Steines vom Kelchsystem in das Nierenbecken oder von dort in den Harnleiter. Es kann zu Abflubehinderungen und somit zum Auftreten eines Hydrokalyx bzw. einer Hydronephrose kommen. Bei zusätzlicher Infektion entstehen lebensbedrohliche Krankheitsbilder wie Pyonephrose und Urosepsis.

Einen besonderen Stellenwert bei der Diagnostik einer Urolithiasis hat die Beurteilung des Urinbefundes. Mittels Teststreifenmethode ist eine Hämaturie nachweisbar. Im Rahmen der mikroskopischen Untersuchung des Sedimentes weisen die Erythrozyten eumorphe Formen auf. Weiterhin ist es mittels dieser Methode möglich, charakteristische Kristallformen zu finden. Wichtig ist die Durchführung eines Urin-pH-Tagesprofils, wobei saure Werte auf Harnsäuresteine und gelegentlich Zystinsteine, alkalische Werte auf eine renaltubulre Azidose und Infektsteine hinweisen. Bei Normalwerten sind oft Kalziumoxalatsteine zu finden. Im Rahmen der Gewinnung eines 24-h-Sammelurins werden die Parameter Volumen, pH-Wert, Kalzium, Magnesium, Phosphat, Harnsäure, Oxalsäure, Zitronensäure und Zystin bestimmt. Sie können Hinweise auf die Genese einer Steinerkrankung geben. Die Bestimmungen der Serumwerte für Kalzium, Phosphor und Harnsäure sind bei der Ursachensuche einer Steinentstehung unerlässlich.

2. Tumorerkrankungen

Tumoren werden in benigne und maligne Formen unterteilt. Beispiele für die erstgenannte Form sind Erkrankungen wie die Benigne Prostatahyperplasie, die sich im höheren Mnneralter entwickelt. Als Formen der malignen Tumoren sind insbesondere das Nierenzellkarzinom, die Nierenbecken- und Harnleitertumoren, Blasentumoren sowie das Prostatakarzinom zu nennen.

- Nierentumoren

An malignen Tumoren des Nierenparenchyms erkranken doppelt so viele Männer wie Frauen (2). Als mögliche ätiologische Faktoren werden Tabak- und Kaffeegenu, Kadmiumexposition, genetische sowie hormonelle Einflüsse und fettreiche Kost angesehen.

Etwa 80 % aller Nierentumoren sind Nierenzellkarzinome. In 50 % der Fälle ist der untere Nierenpol befallen, 2% der Nierenzellkarzinome sind bilateral. Eine Metastasierung ist in 50% bis 75 % auf hämatogenem Wege vorhanden.

- Nierenbecken- und Harnleitertumoren

Das Urothelkarzinom stellt die Hauptgruppe dieser Erkrankungsformen dar. Es wird bei doppelt sovielen Männern wie Frauen diagnostiziert, wobei das Verhältnis bei den Harnleitertumoren ausgeprägter ist.

Karzinogene wie Betanaphtylamin, chronischer Phenazetinabusus, exzessive Zufuhr von Cyclamaten und Tryptophanmetaboliten im Urin von Rauchern werden als mögliche Ursachen von Nierenbecken- und Harnleitertumoren diskutiert. Chronische Irritationen wie Entzündungen und Steinerkrankungen fördern statistisch die Tumorentstehung (2).

- Blasentumoren

Epitheliale Tumoren wie das hauptsächlich vorkommende Urothelkarzinom stehen mit 90% bis 95% an erster Stelle der Blasentumoren. Ätiologische Faktoren entsprechen denen der Nierenbeckentumoren und Ureterkarzinome. Zusätzliche Karzinogene sind die chronischen Harnwegsinfektionen, insbesondere die Bilharziose, sowie Harnwegsobstruktionen. Männer sind dreimal sooft befallen wie Frauen. Eine Ursache hierfür liegt höchstwahrscheinlich in der obstruktiven Prostatahyperplasie (109).

Das Plattenepithelkarzinom entwickelt sich aus der Blasenmukosa oder einem papillären Karzinom mit Metaplasie oder einer Leukoplakie. Tumoren in Divertikeln der Harnblase stellen histologisch gesehen oft diesen Typ der Erkrankung dar.

Das Adenokarzinom entstammt den von Brunnerschen Zellnestern. In 10% der Fälle entwickelt sich bei Blasenextrophie ein solcher Typ von Blasentumor (2).

- Prostatakarzinom

Histologisch stellen 98% der Karzinome Adenokarzinome dar. Das intraduktale Urothelkarzinom, das Plattenepithelkarzinom und das schleimbildende Karzinom treten äußerst selten auf. Diese Formen der Tumorerkrankungen haben ihren Häufigkeitsgipfel in der 7. und 8. Lebensdekade. Im Unterschied zur benignen Prostatahyperplasie entsteht das Karzinom in der peripheren Zone der Vorsteherdrüse. Als Ursachen werden hormonelle Faktoren angesehen. Besondere Bedeutung beim Wachstum der Prostatazellen hat das Dihydrotestosteron, welches an Chromatinstrukturen spezifische Zellsyntheseleistungen induziert (2).

Führende Symptome der Tumoren der ableitenden Harnwege sind die Makro- oder Mikrohämaturie. Diese stellen kein Frühsymptom, sondern den Ausdruck eines zerfallenden Harnleiter- oder Blasentumors bzw. das Zeichen eines in das Nierenbecken einbrechenden Nierentumors dar (2). Die initiale Hämaturie deutet auf einen Prozeß in der Harnröhre, die terminale Hämaturie auf Erkrankungen der hinteren Harnröhre, des Blasenhalses bzw. des Trigonums hin. Totale Makrohämaturien sind bei Blasenkrankungen oder Veränderungen des oberen Harntraktes zu finden. Nierentumoren können weiterhin klinisch durch Schmerzen auffallen, wobei kolikartige Beschwerden für Koagel- bzw. Tumorpartikelabgänge oder Harnleitertumoren sprechen. Weiterhin kann sich eine Tumorerkrankung der Harnblase hinter zystitischen Beschwerden verbergen. Die Prostatahyperplasie fällt durch einen abgeschwächten Urinstrahl, einen verzögerten Miktionsbeginn und Nachträufeln auf. Diese Beschwerden können aber auch bei Tumoren des Blasenhalses bzw. des Prostatakarzinoms vorhanden sein.

1.4. CHARAKTERISTIKA EUMORPHER UND DYSMORPHER ERYTHROZYTENFORMEN

1.4.1. MIKROSKOPISCHE DIFFERENZIERUNG DER ERYTHROZYTENFORMEN

Erythrozyten im Urin bei einer nichtglomerulärer Genese der Hämaturie besitzen bei der Beurteilung im Lichtmikroskop meist die Gestalt von normalen Erythrozyten aus dem Blut. Die Zellen sind eumorph und glatt konturiert und weisen ein homogenes Aussehen auf. Abhängig von der Osmolarität des Urins treten Erythrozyten mit bzw. ohne Doppelkontur, Stechapfelformen oder Schatten auf. Beträgt der Anteil nichtglomerulärer Erythrozyten im Urinsediment mehr als 90% sind dies Hinweise auf Schädigungen der ableitenden Harnwege (109). In Abbildung 3 a erfolgt die Darstellung eumorpher Zellen.

Liegen Erkrankungen des Nierenparenchyms vor, sind im Urin oft dysmorphe Zellen zu finden, eine Darstellung erfolgt in Abbildung 3 b.

Im Jahre 1887 wurden von NIKOLAUS FRIEDREICH erstmals veränderte Erythrozytenformen im Urin bei Erkrankungen der Nieren beschrieben (31). Weitere Veröffentlichungen folgten von ADDIS und LARCOM (1). Die Methode der Erythrozytenbeurteilung blieb lange Zeit ohne Bedeutung. Erst durch die Beschreibung von FAIRLEY und BIRCH im Jahre 1979 (27) ist das Vorkommen von dysmorphen Erythrozyten als Hinweis auf glomeruläre Genese einer Hämaturie vermehrt beachtet worden.

Dysmorphe Erythrozyten besitzen nach THIEL (138) folgende Charakteristika:

- Hämoglobinverarmung
- Extrusion
- Membranfaltung
- spezifische Formveränderungen, z.B. Ringformen.

Auf der Grundlage der morphologischen Unterschiede differenzierten THIEL und Mitarbeiter Ringformen sowie destruierte Formen. Die Ringformen können gewellt, geschlitzt, mit Exo- oder Endozapfen, mit Exo- oder Endokugeln auftreten, siehe Abbildung 7.

Ringförmige dysmorphe Erythrozyten mit Exokugeln werden als Akanthozyten bezeichnet. Eine Unterscheidung der verschiedenen Erythrozytenformen ist durch den erfahrenen Untersucher bereits im Hellfeldmikroskop zu treffen. Weiterhin sind Beurteilungen mit dem Phasenkontrastmikroskop bzw. nach Färbeprozessen, z.B. DAB-Färbung, möglich.

BARTL konnte im Jahre 1997 (4) durch die Bestimmung der optischen Dichte eine Hämoglobinverarmung dysmorpher Erythrozyten nachweisen.

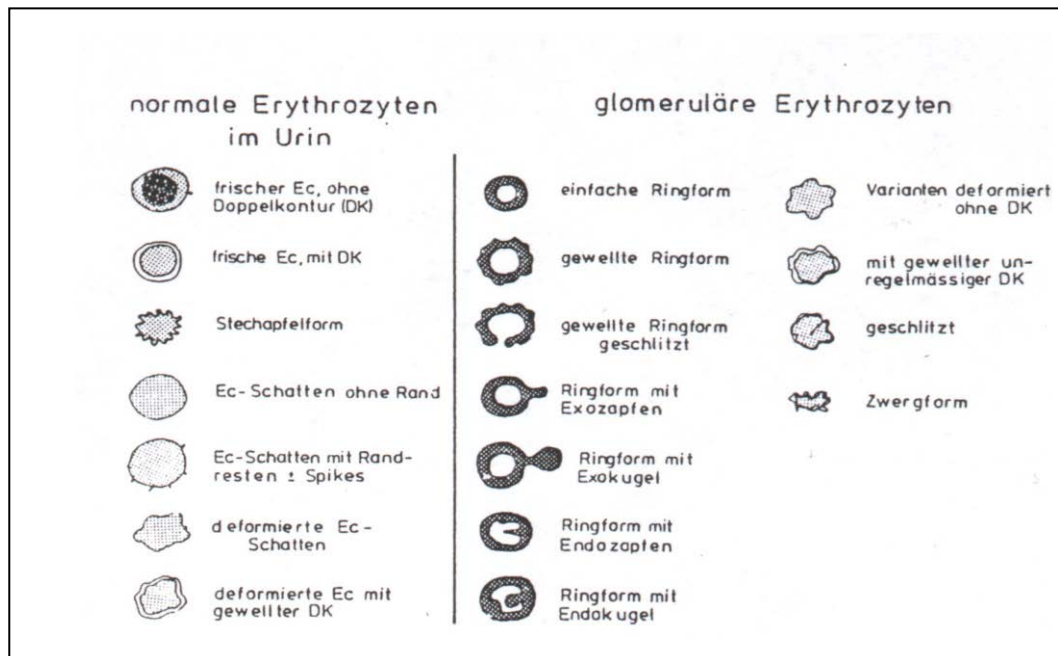


Abbildung 7: Klassifikation eumorpher und dysmorpher Erythrozyten nach THIEL (138)

HILDEBRAND und Mitarbeiter haben den einzelnen Erythrozytenformen Eigennamen gegeben (63). Sie unterscheiden zwischen Diskozyt, Echinozyt, Sphärozyt, Stomatozyt, Knizozyt, Codozyt usw. Dadurch wird aber das im Grunde einfache morphologische Phänomen nur unnötigerweise verkompliziert (138).

TOMITA und KITAMATO, NAKAYAMA und SATO schlagen eine weitere Klassifikation der Erythrozyten zur Differenzierung des glomerulären bzw. nichtglomerulären Ursprungs vor (141). Nichtglomeruläre Erythrozyten wurden in die Kategorien n1 bis n5 mit jeweils zwei bis vier Untergruppen, glomeruläre Erythrozyten in die Kategorien g1 bis g6 mit zwei bis sechs Untergruppen differenziert. Bei der Untersuchung im Hellfeld- bzw. Polarisationsmikroskop gestaltet sich jedoch die Zuordnung der einzelnen Zellen bei der Vielzahl der Kategorien schwierig, oder sie ist überhaupt nicht möglich.

In dieser Arbeit wurde die Einteilung nach THIEL, wie sie in Abbildung 7 dargestellt ist, zur Bewertung zugrunde gelegt (138). Durch Untersuchungen von BIRCH et al., RIZZONI et al. und CONSELMANN konnte die hohe Sensitivität bis zu 99 % sowie Spezifität bis zu 93 % dieser Methode bestätigt werden (8, 21, 106).

Beträgt der Anteil der dysmorphen Erythrozyten im Urin 30 % und mehr, ist dies ein deutlicher Hinweis auf eine glomeruläre Erkrankung (138). Andere Autoren wie DE SANTO, FÜNFSTÜCK, RIZZONI und ROTH geben diesen Grenzwert zwischen 40 und 80 % dysmorpher Zellen an (24, 37, 106, 108).

BIRCH und FAIRLEY fanden im Jahre 1983 bei 86 von 87 Patienten dysmorphe Erythrozyten im Urin (8). Die Diagnose der Glomerulonephritis wurde nach der mikroskopischen Untersuchung mittels Nierenbiopsie bestätigt. Die Arbeitsgruppe von R. FÜNFSTÜCK et al. konnte bei Untersuchungen von 101 Patienten mit histologisch gesicherter Glomerulonephritis durchschnittlich bei $68,3 \pm 24$ % dysmorphe Zellen beobachten. In dieser Studie waren 17 % Akanthozyten nachweisbar (36).

Obwohl für einen Patienten mit Glomerulonephritis die Ausscheidung dysmorpher Zellen, insbesondere von Akanthozyten, ein pathognomisches Zeichen ist, läßt der Nachweis derartiger Erythrozyten keine Aussage über die histopathologischen Veränderungen zu. Die Inspektion des Urinsedimentes kann eine exakte histologische Diagnostik des Biopsiematerials, die letztlich für eine Therapieentscheidung bei einer Glomerulonephritis wichtig ist, nicht ersetzen. Weiterhin ist eine Tumorerkrankung durch die Beurteilung der Erythrozyten im Harnsediment nicht auszuschließen oder zu beweisen (34).

1.4.2. ENTSTEHUNG DER HÄMATURIE BEI NICHTGLOMERULÄRER GENESE

Im Gegensatz zur Hämaturie glomerulärer Genese treten bei Erkrankungen wie Urolithiasis und Tumoren der ableitenden Harnwege andere Mechanismen auf, die zum Übertritt der Erythrozyten in den Urin führen.

Nach Schleimhautirritationen durch Konkrementen sind morphologische Veränderungen wie Hyperämisierung und Ödembildung des Urothels vorhanden. Gefäßerweiterungen sind die Folge. Es treten Perforationen des Gefäßendothels auf, welche den Übertritt von Erythrozyten durch die Gefäßwand möglich machen (2).

Im Rahmen proliferierender Zellkomplexe, wie sie bei Tumoren auftreten, findet man lokal varikös veränderte Venen mit verminderter Elastizität vor. In diesen Fällen kommt es oft zu Einrissen dieser Gefäßmembran. Die in den Urin gelangten Erythrozyten sind jedoch den häufig wechselnden Osmolaritäten, wie sie im tubulären System der Nieren zu finden sind, nicht ausgesetzt (2, 104, 121).

1.4.3. PATHOGENETISCHE ASPEKTE DER ENTSTEHUNG DYSMORPHER ERYTHROZYTEN

1.4.3.1. AUFBAU DER ERYTHROZYTENMEMBRAN

Erythrozyten sind Zellen, die aus einer einzigen Organelle, dem Plasmalemm, bestehen. Das Plasmalemm stellt nicht nur eine mechanische Barriere zwischen dem Zytoplasma und dem extrazellulären Bereich dar, sondern dient auch der Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle. Die Zellmembran ist für verschiedene Stoffe selektiv permeabel, weiterhin sind auch aktive Transportmechanismen vorhanden (52). In Abbildung 8 ist der Aufbau der Erythrozytenmembran nach HALBHUBER et al. dargestellt (60).

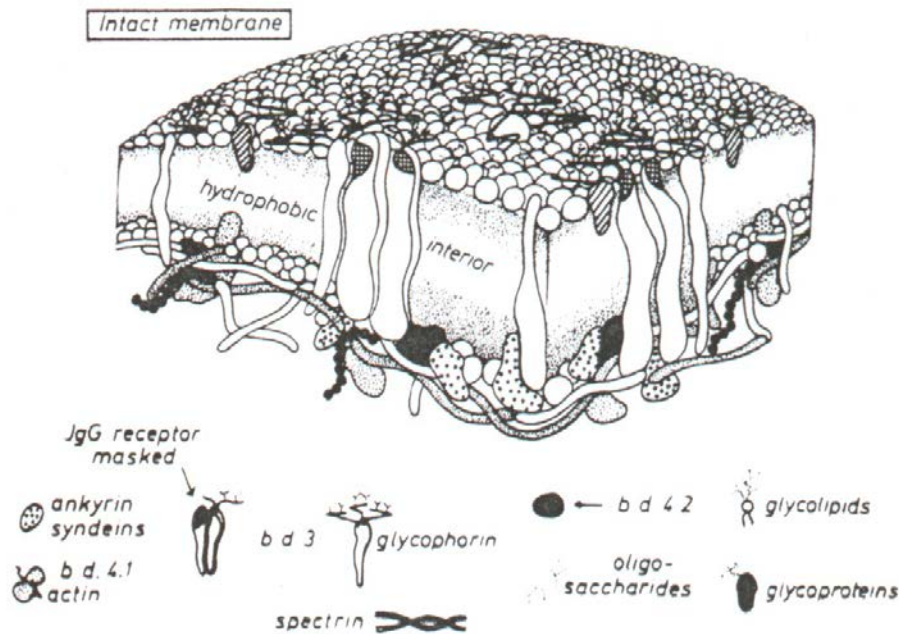


Abbildung 8: Modell der Struktur der Erythrozytenmembran nach HALBHUBER (60)

Die Außenschicht des Plasmalemm wird als Glykokalyx bezeichnet und wird aus den nach außen ragenden Sacharidketten der Glykolipide, Glykopeptidsegmente, der transmembranösen Proteine und der Ektoproteine der äußeren Lipidfacette gebildet. Viele Oligosaccharidketten sind terminal mit Sialinsäure besetzt, dadurch entsteht eine negative Oberflächenladung.

Die Struktur der Glykokalix stellt den Angriffspunkt für Signale aus dem Extrazellularraum dar und bestimmt ebenfalls die Rezeptornatur. Über Konformationsänderungen der beteiligten Membranproteine und -lipide werden intrazelluläre Reaktionen ausgelöst sowie der Informationsaustausch mit der Umgebung gewährleistet (60).

In der Glykokalix sind die Blutgruppenderminanten und Rezeptoren, beispielsweise für Lecitine und IgG, eingelagert. Das IgG-Rezeptor-tragende Protein ist das Bande-3-Protein. Nach Kontakt mit spezifischen Regionen des IgG, z.B. FAB-Region, werden diese an die Membran gebunden (70).

Eine Beladung der Rezeptoren mit IgG ist Voraussetzung zur Erkennung der Erythrozyten und für den Abbau im Reticulo-Histiozytären System. Die Mechanismen, welche zur Demaskierung der Rezeptoren führen, sind bisher nicht bekannt (58).

Die Zellmembran besteht zu 52% aus Proteinen, zu 40 % aus Lipiden und zu 8% aus Kohlenhydraten. Grundbaustein ist die Lipiddoppelschicht mit den nach außen gerichteten Lipidkopfgruppen, zwischen denen sich der hydrophobe apolare Anteil befindet (41, 42, 43). Somit wird die Trennung des Außen- und Innenmilieus der Zelle gewährleistet.

Protein- und Kohlenhydratbestandteile bewirken den aktiven Transport sowie den passiven Fluß von Ionen und hydrophilen Substanzen. Sie sind wichtig für den Informationsaustausch, aber auch für die Stabilisierung des gesamten Zellcharakters (43).

Proteine treten als Transmembran- und Ektoproteine auf. Ektoproteine der Innenlamelle stehen im dynamischen Austausch mit dem Zytoplasma, so daß eine enge Beziehung zu den Zytosolproteinen besteht. Anionenaustauschproteine, 90% des Bande-3-Proteinkomplexes und Glykophorin A bilden die Hauptgruppen der Transmembranproteine. Glykophorin A enthält 70% der Sialinsäure und 50% der Kohlenhydrate der Erythrozyten und bildet die Zellmembran von außen bedeckende Glykoproteinschicht die eine negative Oberflächenladung besitzt. Weitere Bestandteile dieser Schicht sind Glykophorin B und C sowie Anionenaustauschproteine, Ektoproteine und Glykolipide. Das Bande-3-Protein soll als Rezeptor für Antikörper vom Typ IgG 1 und IgG 3 dienen, die im Blutplasma zirkulieren. Hauptbestandteile des Membranskeletts sind die Proteine Spectrin, Actin und Protein 4.1., die verschiedene Bindungen mit der Innenlamelle eingehen. Spectrin der Gruppe α und β bilden 30% des Membranproteins (52, 53, 58, 60). Das membranöse Skelett weist bei mechanischer Beanspruchung eine große Variabilität auf und kann auch nach Wirkung hoher Scherenelastizitäten wieder die Ausgangsstruktur annehmen (90). Nach SCHEVEN und STIBENZ entsteht diese enorme Elastizität kernloser Membranen dadurch, daß die Spektrienfilamente der Heterodimeren, in einer räumlichen Organisation als Schleifen angeordnet, ins Zellinnere hineinreichen. Durch eine Änderung dieser Konfiguration wäre ein Durchtritt der Erythrozyten durch die vorgeschädigte glomeruläre Basalmembran somit möglich (112).

1.4.3.2. SCHÄDIGUNGSMECHANISMEN DER ERYTHROZYTEN

Die Passage der Erythrozyten in den Kapselraum der Bowmanschen Kapsel findet durch die glomeruläre Basalmembran statt. Von der Arbeitgruppe MOURADIAN und SHERMAN (91) konnte dies bereits im Jahre 1975 und von KUBOTA im Jahre 1988 (83) beobachtet werden.

Eine Passage dieser Zellen durch die Basalmembran ist nur möglich, wenn diese morphologische Veränderungen in Form von Rissen, Schlitten und/oder vergrößerten Poren aufweist. BOHLE et al. vermuten, daß diese kompletten oder inkompletten Rupturen durch lysosomale Enzyme aus dem Podozyten entstehen, wenn diese in der Basalmembran eingelagerte Immunkomplexe herauslösen (12, 14).

LIN-JAY-TRUNG und Mitarbeiter gehen davon aus, daß die verformbaren roten Blutzellen bei einem Kapillardruck von 45 mm Hg und bei zusätzlichem Auftreten von Turbulenzen durch eine präformierte Lücke in der glomerulären Basalmembran gepreßt werden. Dabei muß die Perforation einen Durchmesser von mehr als 25 μ m aufweisen (86).

Es existieren verschiedene Vorstellungen zu Mechanismen und zur Lokalisation der Schädigung der Erythrozyten. BIRCH et al. und FASSETT sehen die Ursache in den unterschiedlichen pH-Werten und Osmolaritäten, denen die Erythrozyten bei ihrer Passage durch das tubuläre System ausgesetzt sind (27, 30). Veränderungen der Erythrozytenmembran durch die Phagozytoseaktivität tubulärer Epithelzellen wurden von KINCAID SMITH vermutet (74). Für einen entscheidenden Einfluß des tubulären Systems spricht auch die Beobachtung von SCHÜTZ und Mitarbeitern, daß sich die Rate der dysmorphen Erythrozyten durch furosemid-induzierte Diurese signifikant verringert. Sie nehmen eine Schädigung der Erythrozyten im distalen Tubulus an (119).

Von der Arbeitsgruppe CLASTER et al. wird die Meinung vertreten, daß Proteasen aus neutrophilen aktivierten Monozyten und hydropisch geschwollenen Endothelzellen freigesetzt werden (20). Danach gelangen sie durch eine gestörte Filtrationsfraktion der glomerulären

Basalmembran in den Primärurin und führen zur Fragmentierung der Glykophorine, der an der Innenseite der Erythrozytenmembran gelegenen Skelettproteine Spektrin und Bande-3-Protein.

Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen des Nierenbiopsiematerials von Patienten mit Glomerulonephritis konnten FÜNFSTÜCK und HALBHUBER (35) nachweisen, daß Erythrozyten in den glomerulären Kapillarschlingen durch hydropisch geschwollene Endothelzellen förmlich eingeschlossen sind. In diesem Abschnitt ist ein homogenes Zytosol nachweisbar. Dagegen fällt im distalen Tubulus auf, daß die Erythrozyten ein aufgelockertes und nur noch wenig elektronendichtes Zytosol besitzen. Die Integrität der Glykokalixmembran dieser Zellen ist deutlich gestört. Topooptische Analysen nach Färbung der Membran mit Toluidinblau beweisen eine ausgeprägte Membranstörung, die während der Passage der Erythrozyten im glomerulären Schlingenkonvolut beginnt und am deutlichsten bei dysmorphen Zellen im Urin auftritt (33). Störungen der Membranarchitektur entstehen durch Verluste von Bande-3-Proteinen, Akyrin und Glykophorin. Die dysmorphen Erythrozyten weisen dabei eine verstärkte IgG Rezeptorexpression auf, was im Blut eine Voraussetzung zum Abbau durch das Retikulo-Histiozytäre System darstellt (33).

HALBHUBER et al. konnten durch Harnstoffinkubation und Wärmebehandlung mechanische Alterationen der Zellen in Form von Vesikelbildungen feststellen. Dabei ist die Erythrozytenmembran im Bereich dieser Vesikel durch eine hohe IgG-Beladung und einen hohen Glukolipidgehalt charakterisiert (54).

Im Jahre 1994 gelang es HALBHUBER und FÜNFSTÜCK (50), typisch dysmorphe Zellen in bis zu 80% der Fälle in vitro zu erhalten. Dies wurde durch Vorbehandlung der Erythrozyten mit Pronase und Chymotrypsin, Papain und Trypsin sowie anschließendem Kontakt mit Lösungen, die hinsichtlich ihrer Osmolarität und des Harnstoffgehaltes denen der verschiedenen Abschnitte des Nephrons entsprachen, möglich.

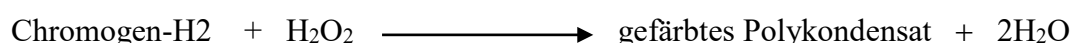
Diese Ergebnisse machen die Annahme wahrscheinlich, daß eine initiale Schädigung der Erythrozyten durch Proteasen im Bereich der glomerulären Kapillarschlingen stattfindet. Die Enzyme werden nach Kontakt mit den hydropisch geschwollenen Endothelien freigesetzt. Bei der weiteren Passage durch das Tubulussystem wird in Folge der sich kurzfristig extrem veränderten osmotischen Bedingungen und durch die Einwirkung der kaotropen Substanz Harnstoff die Erythrozytenoberfläche irreversibel alteriert. Der Verlust von Membranskelettproteinen im Verlauf dieser kumulativen Schädigungen führt zur Ausbildung dysmorpher Erythrozyten (33). Die Untersuchungen von KUBOTA im Jahre 1988 (83) deuten darauf hin, daß mechanische Membranalterationen zusätzlich die typischen Vesikulationen bei Akanthozyten bedingen.

Eine lichtmikroskopische Beurteilung von Erythrozyten aus dem Urinsediment ist ohne Färbung schwierig. Um präzisere Aussagen zur Morphologie und insbesondere zum Hämoglobingehalt der Zellen treffen zu können, sind spezielle Färbemethoden möglich.

1.5. FÄRBUNG VON ERYTHROZYTEN AUF DER GRUNDLAGE DER PSEUDOPEROXIDASEREAKTION MIT DIAMINO BENZIDIN

Die Bedeutung der Peroxidasen im menschlichen Organismus besteht insbesondere im Abbau des giftigen H_2O_2 . Dabei findet eine Umwandlung dieser reaktiven Substanz in Wasser statt.

Die chemische Reaktion spiegelt folgende Formel wider:



Hämoglobin kann als Katalysator der Reaktion eines Chromogenes mit H_2O_2 fungieren. Es erfährt dadurch eine irreversible Anfärbung. Aus folgenden Gründen handelt es sich um eine Pseudoperoxidasereaktion:

1. Die katalytische Wirkung der Pseudoperoxidase ist wesentlich geringer als die der Peroxidase im Organismus
2. Das Hämoglobin als Katalysator wird irreversibel verändert
3. Die pseudoperoxidatische Wirkung ist nur eine Nebeneigenschaft des Hämoglobins (3).

In der medizinischen Praxis wird die Pseudoperoxidasereaktion beim Nachweis von occultem Blut im Stuhl angewendet.

Für die Pseudoperoxidasereaktion sind nach GRAHAM (46), HANKER (61) und KAIHO (69) folgende Chromogene bekannt:

- Diaminobenzidin,
- Paraphenyldiamin-Pyrocatechol,
- Diaminofluoren.

Genauere Untersuchungen zur Erythrozytenmorphologie sind mit der Methode der Elektronenmikroskopie möglich. Insbesondere bei stärkerer Vergrößerung können exaktere Aussagen zur Ultrastruktur formuliert werden.

1.6. LICHTMIKROSKOPIE UND ELEKTRONENMIKROSKOPIE ZUR BEURTEILUNG DER ERYTHROZYTENFORMEN

Zur Klärung der Genese glomerulärer und nichtglomerulärer Erythrozyten sind Untersuchungen der Morphologie, insbesondere des Membranaufbaus unerlässlich.

Zusätzlich zur Lichtmikroskopie bietet die Elektronenmikroskopie Möglichkeiten, auch die Ultrastruktur von Erythrozyten und der Erythrozytenmembran zu erforschen. Die Hauptunterschiede der beiden mikroskopischen Methoden wurden in der Tabelle 6 zusammengefaßt:

MERKMALE	LICHTMIKROSKOPIE	ELEKTRONENMIKROSKOPIE
Auflösung Schnitte	bis ca. 200nm dicker (mit kristalliner Oberflächenstruktur der Metallmesser möglich)	bis ca. 0,1nm viel dünner (nur mit Diamanten- oder Glasmesser wegen amorpher Oberflächenstruktur der Schnittkante)
Einbettungsmaterial Kontrastierung	Paraffin wird herausgelöst mit Färbemitteln	wird nicht herausgelöst mit Schwermetallsalzen (z.B. Osmium-tetraoxid)
Messungen Präparateauflage	der Abschwächung des Lichts Objektträger	der Abschwächung des Elektronenstrahls Grids

Tabelle 6 : Hauptunterschiede zwischen Licht- und Elektronenmikroskopie nach PSCHYREMBEL (99)

2. PROBLEMSTELLUNG

Anliegen dieser Arbeit war es, Erythrozyten die infolge einer Hämaturie im Harn nachweisbar sind, durch histochemische und morphologische Merkmale zu charakterisieren. Die mikroskopische Beurteilung des Urinsedimentes ist zur frühzeitigen Erfassung von Erkrankungen der Harnwege und der Nieren bedeutsam. Durch diese Untersuchung ist es möglich, Hinweise auf den glomerulären und nichtglomerulären Ursprung einer Hämaturie zu erhalten. Sowohl die Beurteilung der Formveränderungen der Zelle als auch die Bestimmung des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten sind hierbei von Bedeutung.

Vergleichende Untersuchungen der genannten Charakteristika bei dysmorphen Formen, die bei einer glomerulären Hämaturie vorkommen, und eumorphen Erythrozyten, die für eine Hämaturie nichtglomerulärer Genese typisch sind, können nach Färbung dieser Zellen und anschließender Beurteilung im Lichtmikroskop erfolgen. Nach Behandlung mit Diaminobenzidin besitzen die Zellen ein rotbraunes Erscheinungsbild, das Konturen und Formen deutlich erkennen läßt.

Mit Hilfe computergestützter Meßtechniken sind im Hellfeldmikroskop neben der Charakterisierung der Morphologie der Zellen auch quantitative Aussagen zu deren Hämoglobinverarmung möglich. Weiterhin kann als ein Maß für die Größe der Zellen der Kreisdurchmesser der Erythrozyten bestimmt werden.

Die Untersuchungen hatten folgende Ziele:

1. Beurteilung der Diaminobenzidinreaktion an Erythrozyten zur Charakterisierung deren Morphologie, zur Bestimmung des Kreisdurchmessers und zum Nachweis des Hämoglobingehaltes der Zellen.
2. Nachweis eventueller Unterschiede der genannten Erythrozytenmerkmale bei einer Hämaturie glomerulärer bzw. nichtglomerulärer Genese.
3. Nachweis von Zusammenhängen zwischen einer eventuell nachgewiesenen Hämoglobinverarmung und Veränderung des Kreisdurchmessers der Erythrozyten und laborchemischen Befunden bei Patienten mit nephrologischen Erkrankungen.
4. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Erythrozyten bei Hämaturie. Dabei soll insbesondere die Verteilung des Hämoglobins bei eumorphen und dysmorphen Zellen charakterisiert werden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1. UNTERSUCHUNGSGRUPPEN

Bei 248 Probanden wurden Untersuchungen vorgenommen. Die Unterteilung erfolgte in drei Gruppen:

1. Patienten mit einer glomerulären Erkrankung

Aus dem Funktionsbereich Nephrologie der Klinik für Innere Medizin IV der Friedrich-Schiller-Universität Jena stammten 40 Patienten; aus der Nephrologischen Praxis Dr. Weiland/ Frau Dr. Hagenberg (Saalfeld) konnten weitere 10 Patienten gewonnen werden. Das mittlere Alter dieser Patientengruppe betrug $40,9 \pm 2,4$ Jahre (31 Männer, 19 Frauen).

Es handelte sich um folgende Erkrankungsfälle:

22 Patienten mit biotisch gesicherter Glomerulonephritis

- 13 Patienten mit mesangioproliferativer Glomerulonephritis
- 4 Patienten mit IgA-Nephritis
- 2 Patienten mit Minimal-Change-Glomerulopathie
- 1 Patient mit Goodpasture Syndrom
- 1 Patient mit Wegnerscher Granulomatose
- 1 Patient mit renaler Beteiligung bei systemischen Lupus erythematodes.

Biopsien wurden im Funktionsbereich Nephrologie der Klinik für Innere Medizin IV der Friedrich-Schiller-Universität Jena vorgenommen. Die histologischen Untersuchungen führte Prof. Dr. U. Helmchen, Direktor der Instituts für Pathologie der Universität Hamburg-Eppendorf, durch.

Bei 28 Patienten erfolgte keine Biopsie. Die Diagnose Glomerulonephritis wurde aufgrund klinischer und paraklinischer Befunde, insbesondere dem Nachweis einer Proteinurie, Hämaturie und Hypertonie gestellt.

2. Patienten mit nichtglomerulären Erkrankungen

Von 98 Patienten mit einer Hämaturie nichtglomerulärer Ursache konnten aus dem urologischen Patientengut der Thüringen-Klinik „Georgius-Agricola“ Saalfeld Urinproben gewonnen werden. Es handelte sich um 77 Männer und 21 Frauen mit einem mittlere Alter von $65,0 \pm 1,5$ Jahren. Die Untersuchungsgruppe gliedert sich wie folgt auf:

- Patienten mit malignen Tumoren:

- 28 Patienten mit Urothelkarzinom der Harnblase
- 2 Patienten mit Urothelkarzinom des Nierenbeckens
- 7 Patienten mit Prostatakarzinom
- 2 Patienten mit Hypernephroidem Nierenzellkarzinom.

- Patienten mit benignen Tumoren

- 11 Patienten mit Benigner Prostatahyperplasie

- Patienten mit Urolithiasis:

- 33 Patienten mit Nephrolithiasis
- 11 Patienten mit Ureterolithiasis
- 4 Patienten mit Cystolithiasis vesicae.

Bei Tumorerkrankungen erfolgte die histologische Sicherung der Diagnose.

Die Harnsteine wurden nach erfolgtem Spontanabgang bei konservativer Therapie bzw. extrakorporaler Stoßwellenlithotripsie, nach Ureterorenoskopie mit Steinextraktion, Schlingenextraktion oder offener Uretero- bzw. Nephrotomie infrarotspektroskopisch untersucht.

3. Vergleichsgruppen gesunder Probanden

Die Vergleichsgruppen 1 und 2 setzten sich jeweils aus 35 gesunden Männern und 15 gesunden Frauen zusammen. Es handelte sich um Personen aus der ambulanten urologischen Sprechstunde der Thüringen-Klinik „Georgius Agricola“ Saalfeld, die im Rahmen der Vorsorge untersucht wurden, sowie um Angehörige des Personals. Das mittlere Alter betrug $60,4 \pm 2,6$ Jahre. Genaue Erläuterungen zur Unterscheidung der beiden Vergleichsgruppen erfolgen im Abschnitt 3.4.1.

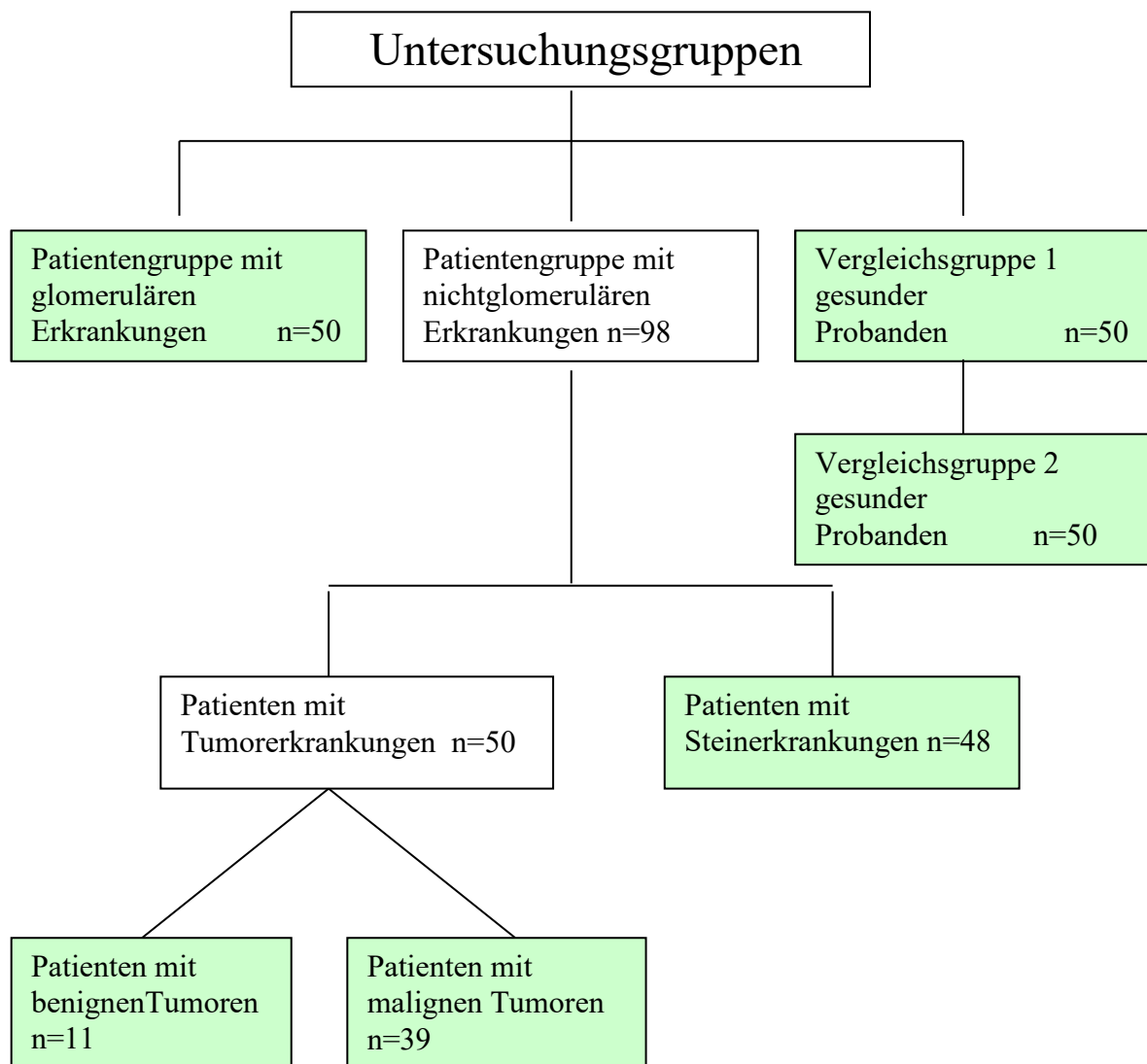


Abbildung 9: Untersuchungsgruppen

3.2.REAGENZIIEN UND GERÄTE

Für die Anfertigung der Spüllösungen, die zur Reinigung des Urins benötigt wurden, für die Färbung des Hämoglobins der Erythrozyten nach Zentrifugation sowie zur Herstellung der Dauerpräparate für die Licht- und Elektronenmikroskopie kamen folgende Reagenzien zum Einsatz:

Dinatriumhydrogenphosphat-12-hydrat	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Kaliumdihydrogenphosphat	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Natriumchlorid	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Aqua dest.	Seradest LFM 20 Fa. Serol
Tris	Fluka-Chemie AG, Schweiz
HCL 1 mol	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Glutaraldehyd 50%ig	Fa. Merk, Darmstadt
Wasserstoffperoxyd 30%ig	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Diaminobenzidin	Fluka-Chemie AG, Schweiz
pH-Wert-Papier	Fa. Bayer
Deckbalsam für mikroskopische Dauerpräparate	Fa. Merk, Darmstadt
Xylol	Fa. Grimm Turkelolow
Propylenoxid	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Alkohol 50%,70%,90%	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Formvar 15/95E	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Parafilm	Fluka-Chemie AG, Schweiz
EPON 815	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Dodencenyl-Bernsteinsäureanhydrid (DDSA)	Fluka-Chemie AG, Schweiz
Methylnadicanhydrid (MNA)	Fluka-Chemie AG, Schweiz
2,4,6 Tris-(Dimethylaminomethyl)- phenyl (DMP30)	Fluka-Chemie AG, Schweiz

Weiterhin wurden zur Herstellung der Spülflüssigkeiten und Präparate sowie zur mikroskopischen Untersuchung folgende Geräte und Arbeitshilfen verwendet:

Zentrifuge	Megafuge 10 von Heraeus Sepateol
Eppendorfszentrifuge	Biofuge 15 R von Heraeus Sepateol
Mikroskop	DMR/BE Mikroskop Leitz der Firma Leika
Personalcomputer	Pentium II, Fa. Conmark
Reagenzgläser	Fa. Nerbe, Eppendorf
Pipetten der Größen 5 ml; 1 ml; 0,2 ml; 0,1 ml; 0,01 ml	Fa. Nerbe, Eppendorf
Objektträger / Deckgläschen	Fa. Hecht, Frontheim/Rhön
Objektträgerhalter	Fa. Hecht, Frontheim/Rhön
diverse Reagenziengefäße	Fa. Hecht, Frontheim/Rhön
Waage	Nr. 2139 der Oshatzer Waagefabrik
Platinöse	Science-Service München
Grids	Science-Service München
Elektronenmikroskop	EM 9002A Firma Zeiss Oberhaching
Ultramikrotom	Reichert Ultracut 5 Firma Leika

3.3. HERSTELLUNG DER SPÜL- UND FIXATIONSGEMISCHE ZUR REINIGUNG DER URINE SOWIE ZUR FÄRBUNG DER ERYTHROZYTEN

Da eine Schädigung der Erythrozyten durch hyper- oder hypoosmolare Verbindungen bzw. membranalterierende Substanzen vermieden werden mußte, erfolgte das Waschen mit speziellen Spüllösungen. Als Chromogen wurde im Versuchsablauf das Diaminobenzidin verwendet. Detaillierte Erläuterungen zur Reinigung der Urine und zur Herstellung der Präparate erfolgen im Abschnitt 3.4.1.

Aus den oben genannten Reagenzien wurden folgende Gemische hergestellt:

1. PBS 300 mosmol

Diese Lösung entstand durch das Mischen von 18,43 g Dinatriumhydrogenphosphat-12-hydrat mit 1,8 g Kaliumdihydrogenphosphat und 5 g Natriumchlorid sowie anschließendem Auffüllen mit Aqua destillata auf das Gesamtvolumen von 1 Liter.

2. PBS 200 mosmol

Es wurde 4,608 g Dinatriumhydrogenphosphat-12-hydrat mit 0,45 g Kaliumdihydrogenphosphat und 0,4 g Natriumchlorid vermischt. Nach Zugabe von Aqua destillata entstanden 250 ml PBS 200 mosmol.

3. Tris-Stammlösung

Dieses Gemisch entstand durch Zufügen von Aqua destillata zu 3.075 g TRIS auf ein Gesamtvolumen von 125 ml.

4. HCL 0,1 mol.

Hierzu wurden 100 ml 1-molare HCL-Lösung mit Aqua destillata auf 1 Liter verdünnt.

5. Tris-HCL-Puffer / pH 7,6

Die Zugabe von 194 ml 0,1 n HCL zu 125 ml Tris-Stammlösung ergibt ein Gemisch mit dem pH-Wert 7,61. Eine Feinkorrektur des pH-Wertes ist durch Hinzufügen von HCL-Lösung möglich. Nach Auffüllen auf 500 ml mit Aqua destillata fand das Versetzen des Gemisches mit 1,9 g Natriumchlorid statt.

6. Inkubationsmedium für die DAB-Reaktion

Eine DAB-Lösung entsteht durch Verdünnung von 80 mg DAB mit 4 ml Aqua destillata sowie Auffüllung auf 40 ml mit Tris-HCL-Puffer. Weiterhin erfolgte die Zugabe von Tris-HCL-Puffer zu 0,6 ml 30%iger H_2O_2 auf ein Gesamtvolumen von 45 ml. Das Inkubationsmedium aus 40 ml DAB-Lösung und 40 ml des H_2O_2 -Tris-HCL-Puffer-Gemisches konnte sofort verarbeitet werden.

3.4. LICHTMIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNG DER ERYTHROZYTEN

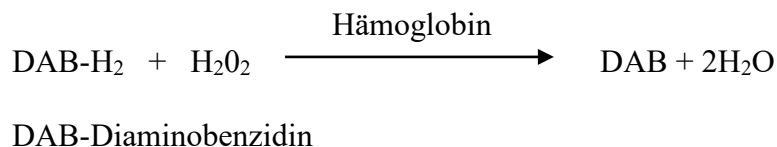
3.4.1. HERSTELLUNG DER ERYTHROZYTENDAUERPRÄPARATE

Wie im Abschnitt 1.5. auf Seite 28 erläutert, ist nach der Färbung der Erythrozyten mit Diaminobenzidin eine gute Beurteilung deren Morphologie möglich. Um die Größe sowie den Hämoglobingehalt dieser Zellen messen zu können, mußten Dauerpräparate angefertigt werden. Zur Auffindung der optimalen Herstellungsmethode wurden Versuchsreihen von insgesamt 110

Probanden gebildet. Nach der mikroskopischen Auswertung der Präparate konnten anhand der gewonnenen Untersuchungsergebnisse folgende Arbeitsschritte festgelegt werden:

Eine Menge von 10 ml Mittelstrahlurin mit einer Osmolarität von 400-800 mosmol, der nicht länger als 4 Stunden und bei 4°C gelagert war, wurde 5 min bei 6000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes von 9 ml erfolgte das Auffüllen von PBS-Spüllösung 300 mosmol auf das Ausgangsvolumen. Eine nochmalige Zentrifugation nach den oben genannten Bedingungen fand statt. Dieser Waschvorgang wurde insgesamt dreimal wiederholt. Das Inkubationsmedium für den Zeitraum von 30 min konnte aus 9 ml Glutaraldehyd und 1 ml Bodensatz hergestellt werden. Somit war eine Fixation und damit eine Sicherung der Stabilität von Form und Hämoglobingehalt der Erythrozyten erreicht. Die Spüllösung wurde nun insgesamt viermal bei oben genannter Drehzahl zentrifugiert. Zwischendurch erfolgten Waschvorgänge. Dabei wurde jeweils 1 ml Bodensatz mit 9 ml Aqua destillata verdünnt. Die anschließende zehnminütige Bodensatzzentrifugation fand bei 12000 Umdrehungen pro Minute statt. Nun erfolgte das Auftragen von 0,1 ml des Bodensatz auf einen Objektträger. Nach dem Trocknen konnten die Präparate mittels Inkubationsmedium durch DAB-Reaktion gefärbt werden. Die Einwirkzeit betrug 30 Minuten bei 20° C (Raumtemperatur). Das Hämoglobin katalysiert die Reaktion von DAB und H₂O₂. Es erfährt dadurch eine Oxygenierung sowie Polymerisierung, so daß die Erythrozyten eine Braunfärbung erhalten. Der Vorgang ist irreversibel. Der überwiegende Anteil dieser chemischen Reaktion findet in den ersten 15 Minuten statt.

Reaktionsformel, bei der Hämoglobin als Pseudoperoxydase und Katalysator wirkt:



Anschließend wurden die Präparate abgespült und luftgetrocknet. Durch Auftragen von Deckbalsam und einem Deckgläschen auf den Objektträger konnten die Dauerpräparate fertiggestellt werden.

Die Anfertigung der Präparate der zwei Vergleichsgruppen erfolgte mit Hilfe folgender Schritte:

Vergleichsgruppe 1: es wurde von den 50 gesunden Personen Venenblut gewonnen und ein Tropfen in 10 ml PBS-Lösung untermischt. Nach anschließendem Waschvorgang, Fixierung mit Glutaraldehyd, Spülung mit Aqua destillata und DAB-Reaktion folgte die Herstellung der Dauerpräparate.

Vergleichsgruppe 2: jeweils 10 ml normoosmolaren Urins wurden von 50 gesunden Probanden gewonnen. Es erfolgte anschließend die Zugabe eines Tropfen Venenblutes derselben Untersuchungsperson. Nach dreistündiger kühler Lagerung konnten der Waschvorgang, die Fixierung mit Glutaraldehyd, die Spülung mit Aqua destillata und die DAB-Reaktion durchgeführt werden.

Ziel dieser differenzierten Präparateherstellung der beiden Vergleichsgruppen war es, den Einfluß der Urininkubation auf die Morphologie, den Kreisdurchmesser und die Mittlere Optische Dichte der Erythrozyten genauer analysieren zu können. Es sollten Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen gesunder Kontrollpersonen unter definierten Bedingungen herausgearbeitet werden.

Bei den Patienten mit glomerulärer Hämaturie wurde vor der Herstellung der Dauerpräparate der Anteil der dysmorphen Erythrozyten im Sediment bestimmt. Hierzu erfolgte die fünfminütige Zentrifugation von 10 ml Urin bei 6000 Umdrehungen pro Minute und die anschließende mikroskopische Auswertung eines Tropfen Bodensatzes bei 400-facher Vergrößerung. Die eumorphen und dysmorphen Erythrozyten wurden ausgezählt und der prozentuale Anteil dieser Formen bestimmt.

3.4.2. BEURTEILUNG DER MORPHOLOGIE DER ERYTHROZYTEN

Die Beurteilung der Erythrozytenmorphologie erfolgte am Mikroskop Leitz DMR/BE der Firma Leica (Deutschland) bei 650-facher Vergrößerung. Nach THIEL wurde in der Gruppe mit dysmorphen Erythrozyten zwischen einfachen Ringformen, Ringformen mit Exokugeln bzw. -zapfen und Ringformen mit Endokugeln bzw. -zapfen unterschieden. Die Differenzierung der Erythrozyten nichtglomerulärer Genese erfolgte in Erythrozyten mit bzw. ohne Doppelkontur und Stechapfelformen (138).

Dysmorphe und eumorphe Erythrozyten sind in den Abbildung 3 a und b (Seite 12) dargestellt. Die Klassifikation nach THIEL kann der Abbildung 7 (Seite 23) entnommen werden.

3.4.3. MESSABLAUF MIT DEM QUANTIMED 500 ZUR BERECHNUNG DER MITTLEREN OPTISCHEN DICHTEN DER ERYTHROZYTEN

Ein Teil der Aufgabenstellung bestand darin, die Morphologie der Erythrozyten zu beurteilen. Weiterhin sollten der Kreisdurchmesser als ein Maß für die Größe der Zellen sowie die Mittlere Optische Dichte berechnet werden.

Die Bestimmung dieser speziellen Erythrozytencharakteristika erfolgte ebenfalls am Mikroskop DMR/BE der Firma Leica bei 650-facher Vergrößerung und monochromatischem Licht der Wellenlänge 551 nm, ein grüner Interferenzfilter wurde verwendet, siehe Abbildung 10. Zur Anwendung kam weiterhin das Software-Programm Quantimed 500 Q-WIN Version V02.00B (85).

Für die Berechnung der Erythrozytengröße bzw. -fläche erfolgte zu Beginn der Messung ein Abgleich des Mikroskopes. Hierzu wurde ein Objektmikrometer benutzt. Es besteht aus einem Objektträger, auf welchem in 10-µm-Abständen eine Graduierung angebracht ist. Diese wird zur Graduierung des Meßschraubenokulars in Beziehung gesetzt, es ergibt sich ein Umrechnungsfaktor von 0,117 µm/Skalenteil. Nach Abschluß dieses Vorganges konnte der Computer die markierten Erythrozyten genau ausmessen.

Nach Einstellung der Erythrozyten im Mikroskop war es mit Hilfe einer Kamera möglich, Teile des Gesichtsfeldes auf den Computerbildschirm zu projizieren. Anschließend wurde ein Standbild erzeugt, welches mit dem Bildanalysesystem Quantimed 500 der Firma Leica weiter bearbeitet werden konnte. Nach vorherigem Grauabgleich wurden die einzelnen Erythrozyten umrahmt und die so markierten Flächen computergestützt ausgewertet.



Abbildung 10: DMR/BE Mikroskop der Firma Leica

Mit dieser Meßmethode konnten von den 250 Präparaten jeweils 50 Erythrozyten ausgewertet werden. Folgende Parameter wurden bestimmt:

1. Fläche der Zelle
2. Äquivalenter Kreisdurchmesser der Zelle
3. Mittlerer Grauwert, welcher die Farbintensität der Erythrozyten nach DAB-Färbung widerspiegelt.

3.4.4. BERECHNUNG DER MITTLEREN OPTISCHEN DICHTEN

Die Mittlere Optische Dichte, welche den Hämoglobingehalt des Einzelerythrozyten beschreibt, wurde aus dem mittleren Grauwert ermittelt. Die Formeln für die Berechnung lassen sich aus den Ausführungen von Oberholzer et al. ableiten (97).

$$T = \frac{MG}{GW-LF} \qquad -\lg T = MOD$$

- T - Transmission
 MG - Mittlerer Grauwert
 GW-LF - Grauwert des Leerfeldes (wurde jeweils gemessen)
 MOD - Mittlere optische Dichte

3.5. HERSTELLUNG DER ERYTHROZYTENDAUERPRÄPARATE FÜR DIE ELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Anfertigung der Präparate für die Elektronenmikroskopie ist mittels Ultramikrotomie oder mittels Ultrakryomikrotomie möglich. Bei der zuletzt genannter Methode werden zur Einlagerung der Materialien hydrophile Kunstharze verwendet.

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an Erythrozyten durchgeführt, welche in Epoxiden, speziell im hydrophoben Epon 812, eingebettet waren. Die Mikrotomschnitte erfolgten mit dem Ultramikrotom "Reichert Ultra Cut 5" der Firma "Leica".

Von Patienten mit einer glomerulären Hämaturie wurden 10 ml Urin fünf Minuten bei 3000 U/min und anschließend der Überstand nochmals fünf Minuten in der Eppendorf-Zentrifuge bei 10.000 U/min zentrifugiert. Im Bodensatz befanden sich die Erythrozytenschatten. Zur Präparation der Zellen für die Anfertigung der Dauerpräparate erfolgte die Eponeinbettung. Dazu wurde der Bodensatz für den Zeitraum von 24 Stunden in PBS-Lösung gewaschen. Es folgte für zwei Stunden die Einlage in 50%-igen Alkohol und anschließend die Lagerung in 70 %-igem Alkohol über die Nacht, welche eine Entwässerung bewirkte. Am nächsten Tag wurde das Untersuchungsmaterial mit 90%-igem Alkohol für eine Stunde, absolutem Alkohol für zwei Stunden und Propylenoxid für zwei Stunden inkubiert. Eine anschließende Verdünnung mit dem reinen Epongemisch ist aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften nicht möglich. Deshalb erfolgte ein schrittweises Zusetzen von Inkubationsmedien, wie sie in Tabelle 7 genannt sind. Dafür wurde dem Untersuchungsmaterial die Substanz 1 und 2 für jeweils eine Stunde, anschließend die Substanz 3 für 22 Stunden hinzugefügt. Am vierten Herstellungstag war es möglich, das reine EPON 812 in kleine Quaderformen, in denen sich die zu untersuchenden Zellen befinden, zu gießen. Die Lagerung bei 22 ° C für eine Stunde und das sich daran anschließende Aushärten bei 65° C für sechs Tage hat das Entstehen eines kleinen Epoxydquaders zur Folge, an dessen Ober- bzw. Unterseite sich die eingelagerten Materialien befinden, die mit dem Ultramikrotom weiterbearbeitet werden können. Die Herstellung der Epon-Gemische erfolgte mit den in der Tabelle 8 genannten Substanzen im entsprechenden Mengenverhältnis.

INKUBATIONSMEDIUM	KOMPONENTEN-ANTEILE	
Substanz 1	1 Teil Epon-Gemisch	4 Teile Propylenoxid
Substanz 2	1 Teil Epon-Gemisch	2 Teile Propylenoxid
Substanz 3	1 Teil Epon-Gemisch	1 Teil Propylenoxid

Tabelle 7 : Zusammensetzung der Inkubationsmedien

MISCHKOMPONENTEN	MENGENANGABE
Dodencenyl-bernsteinsäureanhydrid	4,90 g
Methylnadik-anhydrid	8,90 g
2,4,6-Tris-(Dimethylaminomethyl)phenyl	0,88 g
EPON 812	13,08 g

Tabelle 8: Material- und Mengenangaben zur Herstellung des Epongemisches

Die prismenförmig angespitzten Untersuchungsquader, welche Träger der Erythrozyten sind, wurden in den Mikrotomarm eingespannt. Ein zunächst manuelles und danach bei geringerem Abstand elektronisches Heranführen des Quaders sowie die genaueste Einstellung in drei Ebenen war nur unter mikroskopischer Kontrolle möglich. Anschließend erfolgten elektronisch gesteuert die Semidünnschnitte. Bei dem genannten Gerät wird nur der Mikrotomarms bewegt, nicht aber des

Messers. Die Schnitte erfolgten mit Diamantenmessern. Der Meßwinkel von 6 Grad wurde stets eingehalten. Nachdem Schnittkompressionen beseitigt waren, konnten die Objekte mit Hilfe einer Platinöse auf den Grids, welche einseitig mit einem Paraffinfilm beschichtet sind, abgelagert werden.

3.6. LABORCHEMISCHE BEFUNDE DER PATIENTENGRUPPEN

Aus den Krankenakten der Patienten wurden folgende Parameter zusammengefaßt, die zum Zeitpunkt der Uringewinnung von den Klinisch-Chemischen Laboratorien der Thüringen-Klinik „Georgius Agricola“ Saalfeld und der Klinik für Innere Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena bestimmt worden waren:

Blutwerte:	- Hämoglobin	Cyanomethämoglobinmethode mit BAKER 9000 Fa. Serono Normalbereich Männer: 8,6-12,0 mmol/l Frauen: 7,4-10,5 mmol/l
	- Hämatokrit	Impedanz-Messung mit BAKER 9000 Fa. Serono Normalbereich Männer: 0,40-0,54 Frauen: 0,36-0,47
	- Leukozyten	Impedanz-Messung mit BAKER 9000 Fa. Serono Normalbereich: 3,8-9,8 Gpt/l
	- Thrombozyten	Impedanz-Messung mit BAKER 9000 Fa. Serono Normalbereich: 150-400 Gpt/l
	- Quick-Wert	Bestimmung mit Recombi-Plastin Ortho, ACL Futura, Fa.IL-Company, Lexington, USA Normalbereich: 70-120 %
	- PTT	Bestimmung mit Recombi-Plastin Ortho, ACL Futura, Fa.IL-Company, Lexington, USA Normalbereich: 26-38 sec
Serumwerte:	- Harnstoff	enzymatische Bestimmung mit Urease/uv-Test, Vitros 250, Fa. Johnson & Johnson Normalbereich: 1,7-8,3 mmol/l
	- Kreatinin	kinetische Substratbestimmung nach Jaffe Vitros 250, Fa. Johnson & Johnson Normalbereich Männer: < 97 µmol/l Frauen: < 88 µmol/l
	- Harnsäure	enzymatische Bestimmung mit Urikase-PAP, Vitros 250, Fa. Johnson & Johnson Normalbereich Männer: 200-420 µmol/l Frauen: 140-340 µmol/l

Urin:	- pH-Wert	Multi-Stix 10 SG,Clinitec200 Fa.Bayer Normalbereich: 4-8
	- Erythrozytenanzahl	Multi-Stix 10 SG,Clinitec200 Fa.Bayer Normalbereich: 0-3/GF
	- Proteinmenge	Multi-Stix 10 SG,Clinitec200 Fa.Bayer normal: neg
	- Leukozytenanzahl	Multi-Stix 10 SG,Clinitec200 Fa.Bayer Normalbereich:< 3/GF
	- Glukose	Multi-Stix 10 SG,Clinitec200 Fa.Bayer normal: neg

4. ERGEBNISSE

4.1. MORPHOLOGIE DER ERYTHROZYTEN BEI HÄMATURIE

4.1.1. ERYTHROZYTEN BEI EINER NICHTGLOMERULÄREN HÄMATURIE

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen fiel auf, daß bei den Patienten mit Hämaturie nichtglomerulärer Ursache eine große Anzahl von Erythrozyten vorhanden war. Bei insgesamt 83 der 98 Fälle konnten in jedem Gesichtsfeld mehr als 4 Zellen nachgewiesen werden. Alle Erythrozyten besaßen eine kräftige homogene Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahmen von diesen Zellen sind in der Abbildung 11 ersichtlich.

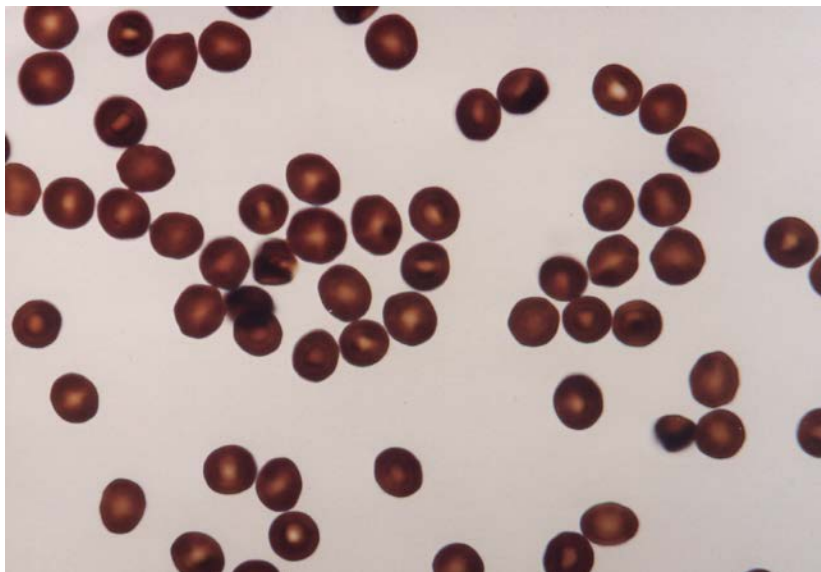


Abbildung 11: eumorphe Erythrozyten, DAB-gefärbt, lichtmikroskopische Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung, Befund des Patienten H.D., 73 Jahre, mit Neoplasma prostatae (Präparat Nr. 23)

Von insgesamt 4840 untersuchten Zellen im Urin dieser Patienten waren 4093 Erythrozyten ohne Doppelkontur, 531 Erythrozyten mit Doppelkontur und 216 Stechapfelformen vorhanden. Die Anzahl der verschiedenen Formen bei den einzelnen Untersuchungsgruppen mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese geben die Diagramme 12 a-c wieder.

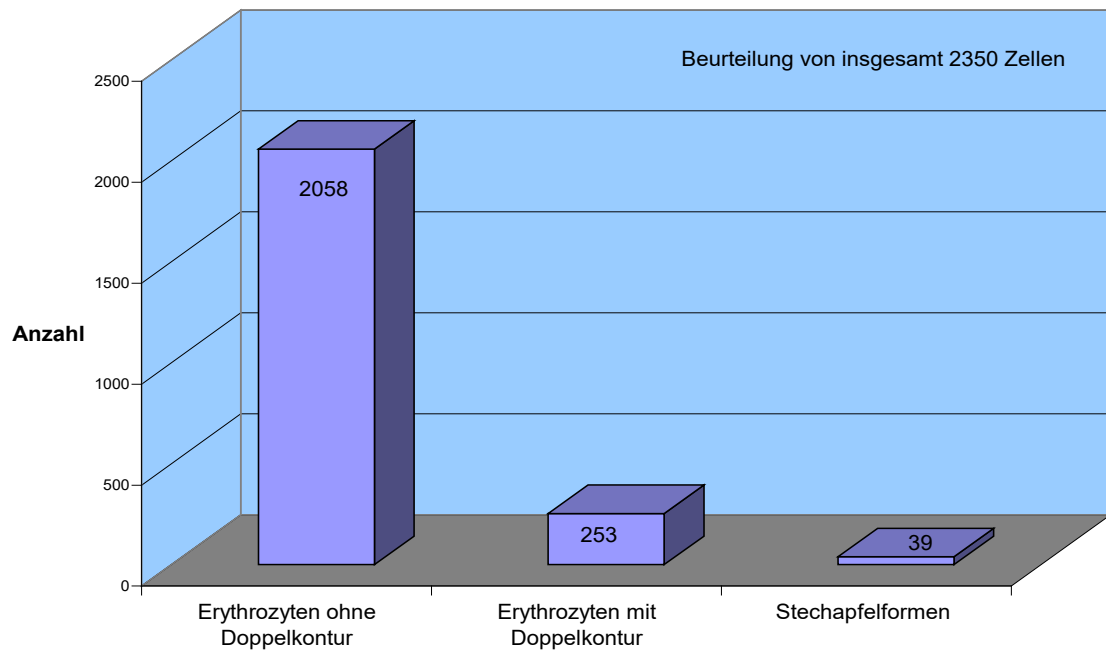


Abbildung 12 a: Verteilung der Erythrozytenformen bei einer Hämaturie infolge Urolithiasis

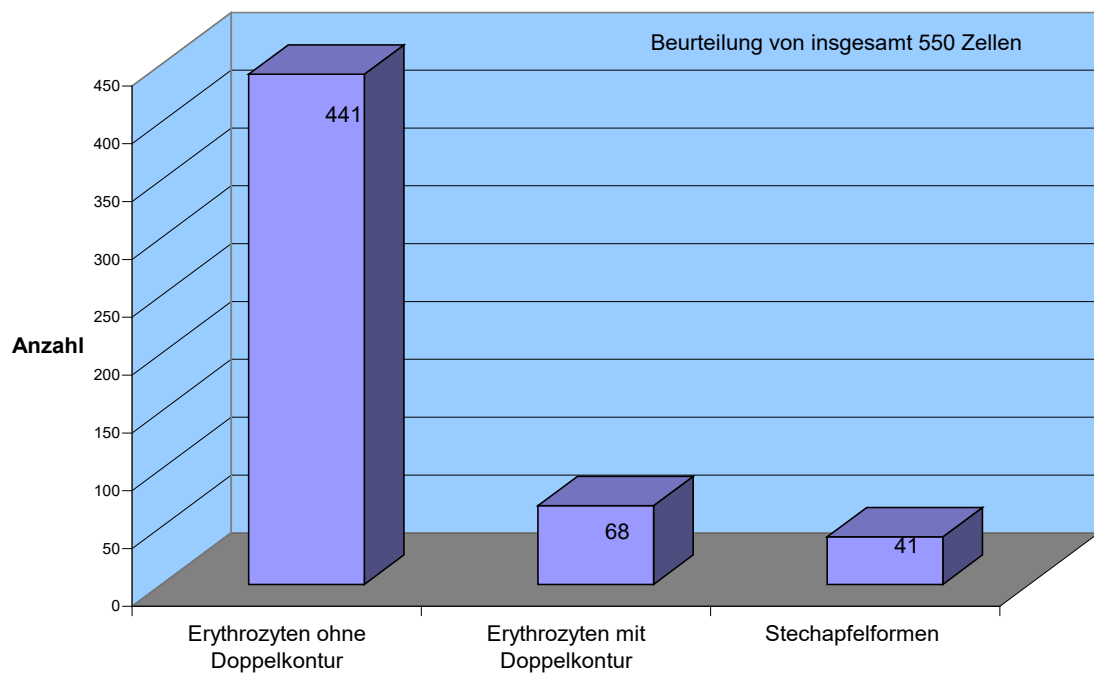


Abbildung 12 b: Verteilung der Erythrozytenformen bei Hämaturie infolge benigner Tumoren

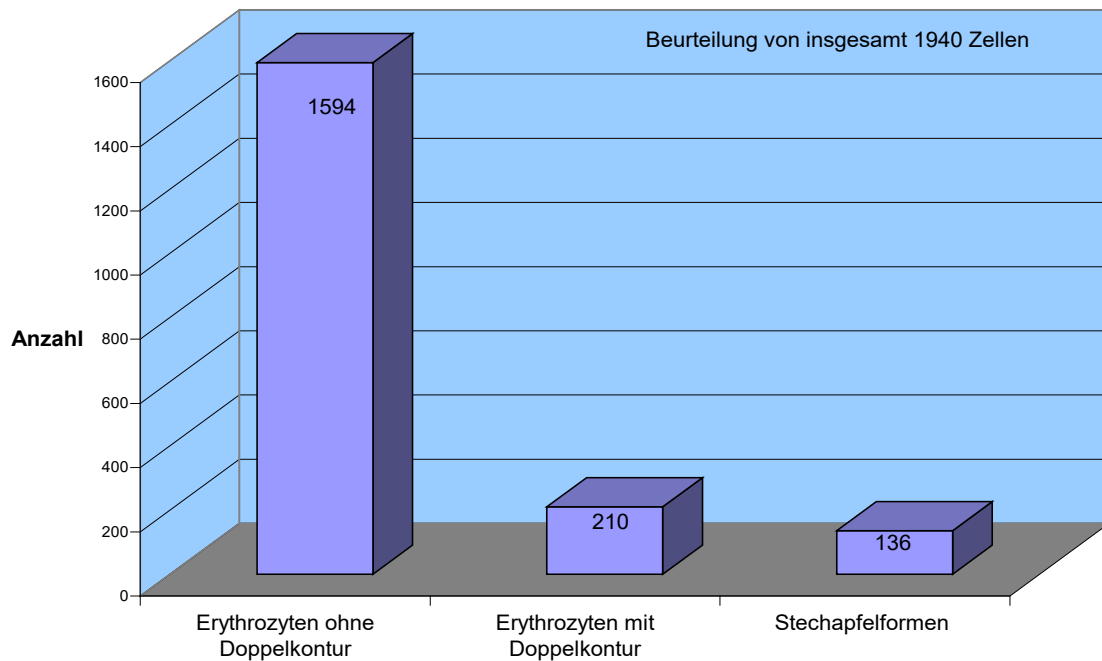


Abbildung 12 c: Verteilung der Erythrozytenformen bei Hämaturie infolge maligner Tumoren

Im Diagramm 12 d erfolgt die graphische Darstellung der verschiedenen Erythrozytenformen der Vergleichsgruppe 1, bei welcher Zellen aus dem Venenblut nach Diaminobenzidin-Färbung beurteilt wurden. Das Diagramm 12 e zeigt die Ergebnisse der mikroskopischen Beurteilung der Vergleichsgruppe 2, bei der die Erythrozyten aus dem Venenblut vor der Färbung im Urin inkubiert wurden. Von den insgesamt 4985 lichtmikroskopisch untersuchten Zellen wiesen 4777 keine Doppelkontur auf. Dies entspricht einem Anteil von 95,8 %. Außerdem waren 96 Erythrozyten mit Doppelkontur vorhanden, das sind 1,95 % der Gesamtzellzahl beider Gruppen. Bei den verbleibenden 2,25 % handelt es sich um Stechapfelformen.

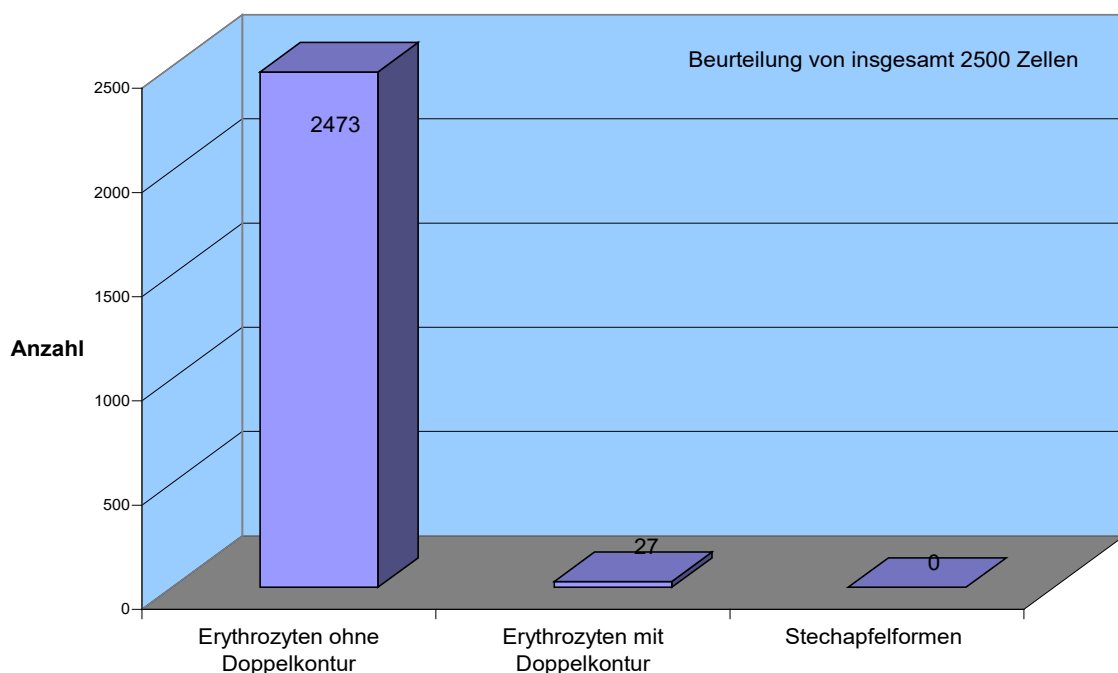


Abbildung 12 d: Verteilung der Erythrozytenformen in der Vergleichsgruppe 1, bei der Zellen aus dem Venenblut mit Diaminobenzidin gefärbt wurden

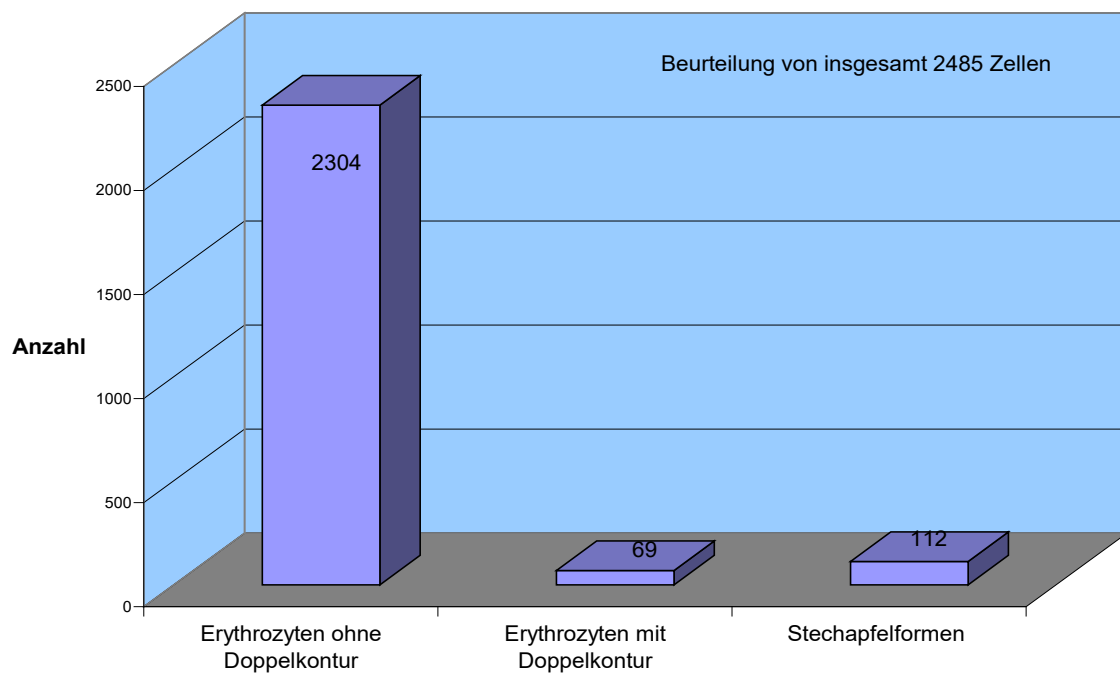


Abbildung 12 e: Verteilung der Erythrozytenformen in der Vergleichsgruppe 2, bei der Zellen aus dem Venenblut vor Diaminobenzidin-Färbung drei Stunden im Urin inkubiert wurden

Die dreistündige Lagerung der Erythrozyten aus dem Blut im Urin vor der Diaminobenzidin-Reaktion hatte Auswirkungen auf die Morphologie der Zellen. Die 112 Stechapfelformen wurden nur in der Vergleichsgruppe 2 beobachtet, sie entsprechen 4,5 % der untersuchten Zellen dieser Präparate. Die Anzahl der Erythrozyten mit Doppelkontur war im Unterschied zur Vergleichsgruppe 1 mehr als doppelt so hoch, 2,78 % versus 1,08 %, siehe Diagramme 12 d und e.

Es konnte festgestellt werden, daß eine Inkubation von Erythrozyten im Urin isomolarer Osmolarität zu erhöhten Raten von Stechapfelformen und Erythrozyten mit Doppelkontur führt.

Diese Feststellung wird auch durch die Untersuchungsergebnisse der Fälle mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese bestätigt. Hier traten noch deutlichere Veränderungen durch die Inkubation im Urin auf. Insgesamt wurden 4,5 % Stechapfelformen sowie 10,97 % Erythrozyten mit Doppelkontur ausgezählt.

In den Abbildungen 12 a-c erfolgte eine zusammenfassende Darstellung der Erythrozytenformen von insgesamt 98 Präparaten bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese. Es ist nicht ersichtlich, wieviele der verschiedenen Erythrozytenformen jeweils in den Einzelpräparaten nachgewiesen wurden. Typische Verteilungsmuster sind in den Abbildungen 13 a und 13 b dargestellt. Es wird deutlich, daß in den Urinsedimenten Erythrozyten mit Doppelkontur, ohne Doppelkontur und Stechapfelformen gemeinsam auftreten können.

Das trifft aber keineswegs in jedem Fall zu, wie Abbildung 13 b zeigt. Bei dem hier dargestellten Präparat waren keine Stechapfelformen nachweisbar. Solche Fälle wurde 76 mal beobachtet. Wie bereits in den Diagrammen der Abbildung 12 a-c dargestellt, ist auch hier ersichtlich, daß bei den Untersuchungen überwiegend Erythrozyten mit Doppelkontur gefunden wurden und die übrigen Formen nur einen geringeren Anteil darstellten.

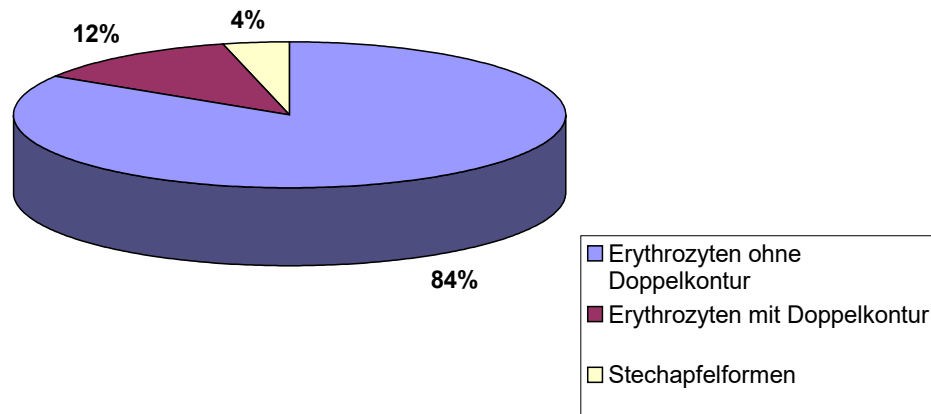


Abbildung 13 a: Quantitative Verteilung eumorpher Erythrozytenformen bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese, Befund des Patienten G.P., 56 Jahre, mit Urolithiasis (Präparat Nr. 6)

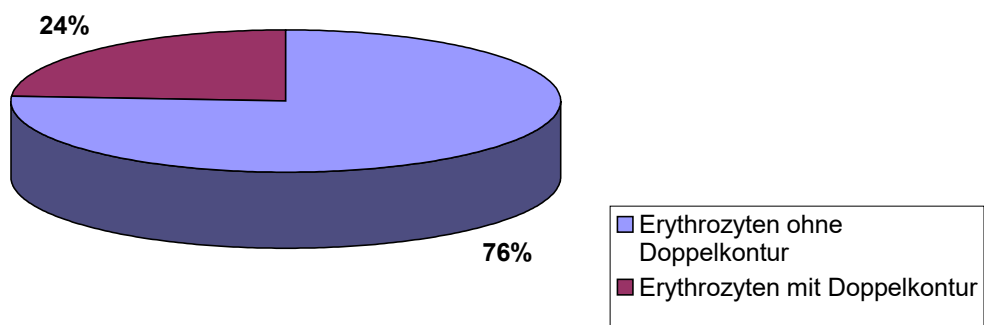


Abbildung 13 b: Quantitative Verteilung eumorpher Erythrozytenformen bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese, Befund des Patienten H.B., 55 Jahre, mit Urolithiasis (Präparat Nr. 10)

4.1.2. ERYTHROZYTEN BEI EINER GLOMERULÄREN HÄMATURIE

Im Rahmen von lichtmikroskopischen Untersuchungen wurde der prozentuale Anteil dysmorpher Zellen im Vergleich zur Gesamtzellzahl der Erythrozyten im Urin bestimmt. Hierzu erfolgte die fünfminütige Zentrifugation von 10 ml Urin bei 5000 Umdrehungen pro Minute. Anschließend fanden Untersuchungen am Ausstrich des Bodensatzes statt.

Es konnte festgestellt werden, daß in den Fällen mit glomerulärer Hämaturie die dysmorphen Erythrozyten deutlich vermehrt vorhanden waren. Der prozentuale Anteil dieser Zellen an der Gesamtzahl der Erythrozyten im Urin betrug 67,1 %, siehe Abbildung 14. Von den 50 untersuchten Urinen enthielten 19 weniger als 70 % dysmorphe Formen. In den Proben 25, 27, 35 und 43 traten besonders geringe Anteile dieser Erythrozyten auf. Es handelt sich hierbei um zwei Fälle mit mesangioproliferativer Glomerulonephritis, einen Fall mit fokalsegmentärer Glomerulonephritis sowie einen Fall mit IgA-Nephropathie.

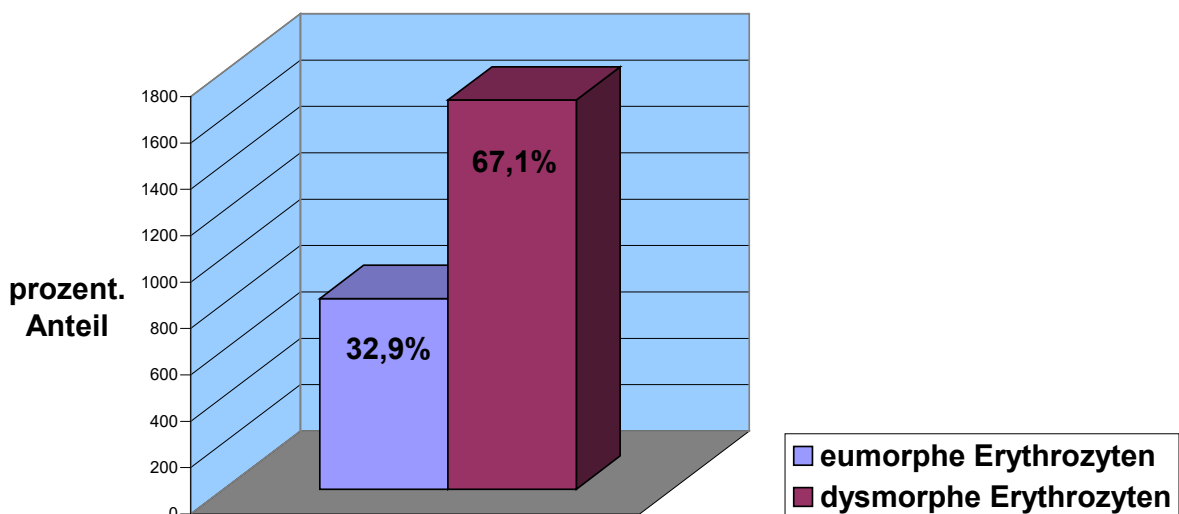


Abbildung 14: Prozentualer Anteil dysmorpher und eumorpher Erythrozyten im Sediment bei glomerulärer Hämaturie (n = 50 Patienten)

Bei der lichtmikroskopischen Auswertung der mit Diaminobenzidin gefärbten Präparate wurde deutlich, daß in der Gruppe mit einer Hämaturie glomerulärer Genese eine signifikant verringerte Erythrozytenzahl vorhanden war. Außer in zwei Präparaten von Patienten mit mesangioproliferativer Glomerulonephritis sowie einem Präparat mit IgA-Nephropathie konnten pro Gesichtsfeld nur drei dysmorphe Zellen gefunden werden.

Einfache Ringformen, solche mit Exo- und Endozapfen und mit Exo- und Endokugeln waren vorhanden. Im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen eumorpher Zellen aus dem Venenblut und dem Urin bei nichtglomerulärer Hämaturie fiel auf, daß sich die Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer Genese verkleinert und nicht so stark gefärbt darstellten. Trotzdem konnten durch einen relativ guten Kontrast die typischen Merkmale dysmorpher Formen wie Membranfaltung und Extrusionen erkannt werden. Vereinzelt kamen auch Erythrozyten vor, die ganz schwach gefärbt und deshalb zahlenmäßig nicht erfaßbar waren.

In der Abbildung 15 erfolgt die Darstellung dysmorpher Zellen. Es sind einfache Ringformen, Erythrozyten mit Exozapfen und Exokugeln, aber auch mit Endozapfen und Endokugeln erkennbar.

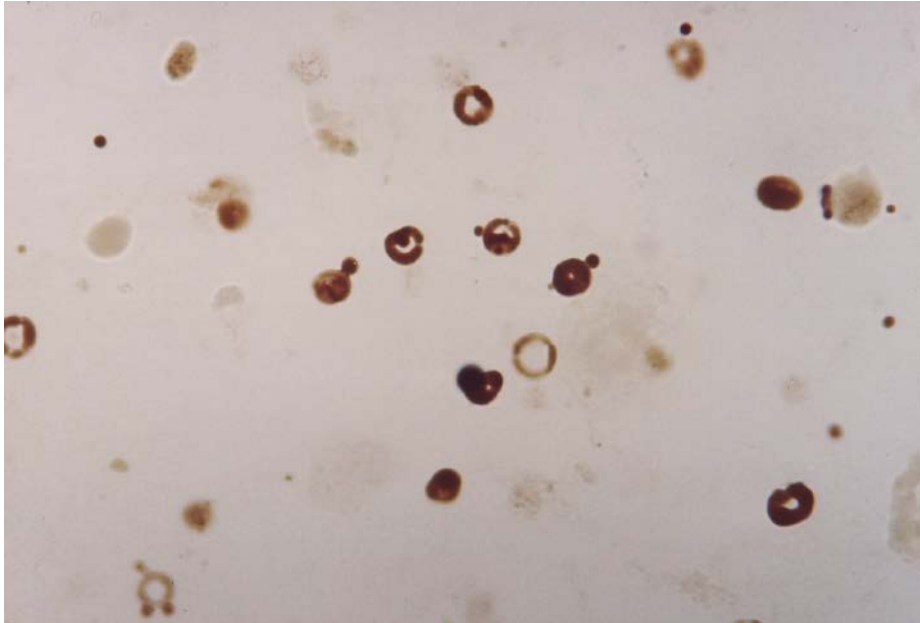


Abbildung 15: dysmorphe Erythrozyten, DAB-gefärbt, lichtmikroskopische Aufnahme bei 400-facher Vergrößerung, Befund der Patientin P.M., 28 Jahre, mit einer IgA-Nephropathie (Präparat Nr. 7)

Die Abbildung 16 zeigt eine Aufstellung der im Rahmen dieser Untersuchung gefundenen Anzahl verschiedener Formen von Erythrozyten glomerulärer Genese. Die Ringtypen mit Exokugeln und -zapfen sowie die Ringtypen mit Endokugeln und -zapfen wurden jeweils in Gruppen zusammengefaßt. Es ist erkennbar, daß mehr Ringformen mit Zapfenbildung als einfache Ringformen auftreten. Die Beurteilung erfolgte an 2320 Zellen.

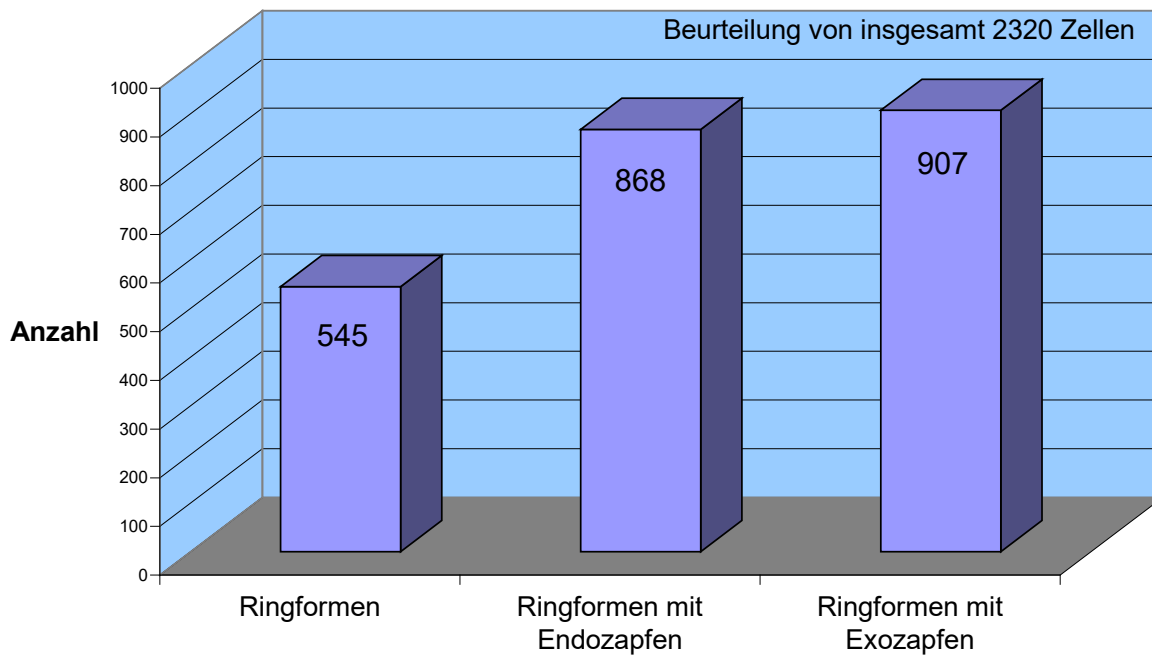


Abbildung 16: Verteilung von Ringformen, Ringformen mit Endozapfen und Exozapfen bei glomerulärer Hämaturie

Aus der Abbildung 16 geht nicht hervor, ob die speziellen Erythrozytenformen nur ganz bestimmte Präparate aufweisen. In Abbildung 17 a wird dargestellt, daß einfache Ringformen, solche mit Exo- und mit Endozapfen in ein und demselben Urin vorhanden waren. Dieses gemeinsame Auftreten der verschiedenen dysmorphen Erythrozyten war in 35 der 50 untersuchten Fällen mit glomerulärer Hämaturie nachweisbar. In 14 Präparaten wurden keine einfachen Ringformen, im Präparat 38 (Hämaturie eines Patienten mit mesangioproliferativer Glomerulonephritis) keine Ringformen mit Exozapfen gefunden.

Es wurde deutlich, daß ein gemeinsames Auftreten der Zellen mit unterschiedlichen morphologischen Veränderungen sich nicht unmittelbar bedingt. Abbildung 17 b stellt die prozentuale Verteilung der dysmorphen Erythrozytenformen des Präparates 21 dar, welches keine einfachen Ringformen zeigte.

Beziehungen zwischen dem Auftreten bestimmter morphologischer Veränderungen der Zellen und den Diagnosen bei glomerulärer Hämaturie wurden nicht festgestellt.

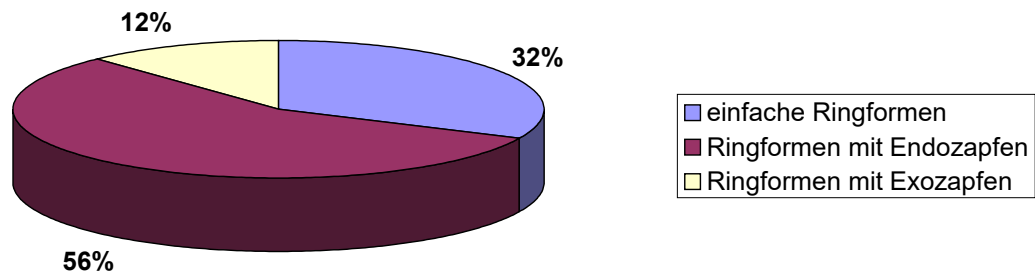


Abbildung 17 a: Quantitative Verteilung dysmorpher Erythrozytenformen bei glomerulärer Hämaturie, Befund des Patienten H.H., 74 Jahre, mit einer Mesangioproliferativen Glomerulonephritis (Präparat Nr. 31)

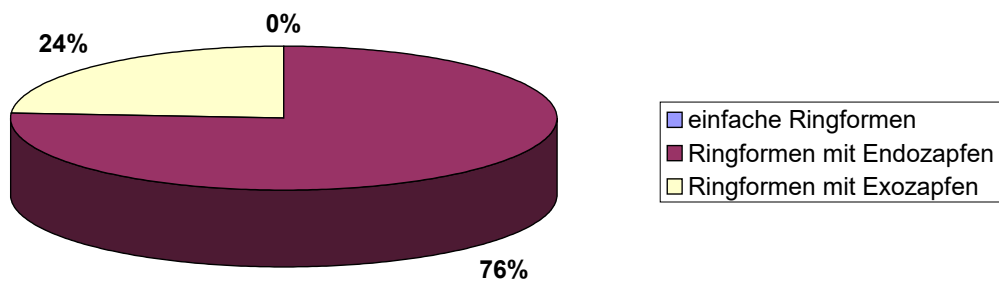


Abbildung 17 b: Quantitative Verteilung dysmorpher Erythrozytenformen bei glomerulärer Hämaturie, Befund der Patientin G.W., 52 Jahre, mit einer Minimal-Change-Glomerulopathie (Präparat Nr. 21)

Bei der Betrachtung der verschiedenen Erythrozytenformen in der Gruppe der glomerulären Hämaturie wurden insgesamt 907 Zellen mit Endozapfen bzw. -kugeln, 868 Zellen mit Exozapfen bzw. -kugeln und 545 Zellen mit einfachen Ringformen ermittelt.

Es sollte herausgefunden werden, ob bei einem unterschiedlichen prozentualen Anteil dysmorpher Erythrozyten im Urinsediment bestimmte Formveränderungen bevorzugt auftreten. Hierzu erfolgte die Einteilung der 50 Präparate der Hämaturie glomerulärer Genese in drei Gruppen. Die in den entsprechenden Dauerpräparaten ausgezählten Erythrozytenformen konnten anschließend zugeordnet werden, siehe Tabelle 9. Der statistische Vergleich zwischen den Gruppen wurde mittels KRUSKAL-WALLIS-TEST durchgeführt. Es war kein signifikanter Unterschied zu finden. Das bedeutet, daß bei einem unterschiedlichen prozentualen Anteil dysmorpher Zellen im Urinsediment weder Ringformen mit Exo- oder Endozapfen, noch einfache Ringformen in einer signifikant vermehrten bzw. verringerten Anzahl auftreten.

Prozentualer Anteil dysmorpher Erythrozyten im Urinsediment	Anzahl der im Dauerpräparat ausgezählten Ringtypen mit Exozapfen	Ringtypen mit Endozapfen	einfachen Ringformen
≤ 50 %	251	158	118
> 50 % ≤ 70 %	342	355	220
>70 %	275	394	207

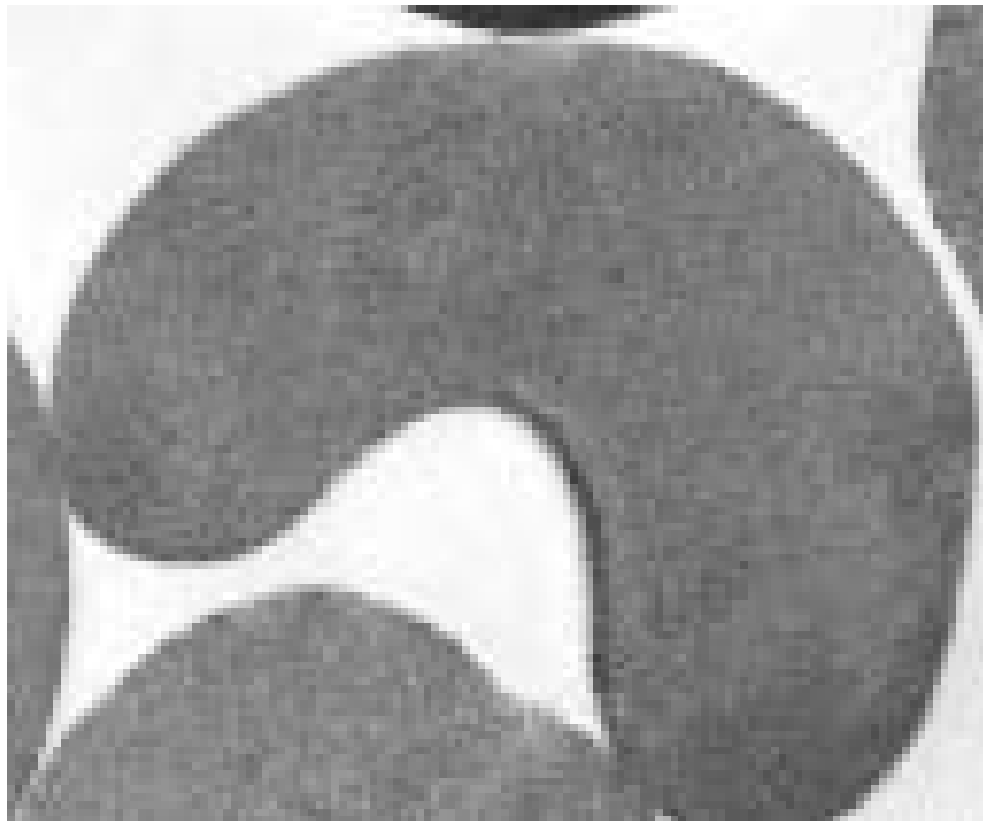
Tabelle 9: Verteilung von dysmorphen Erythrozyten entsprechend ihrem Anteil im Sediment bei glomerulärer Hämaturie (n = 50)

Bei der lichtmikroskopischen Beurteilung des Farb- und Strukturkontrastes der Erythrozyten entstand der Eindruck, daß in den Regionen der Exozapfen und -kugeln eine stärkere Färbung durch das Diaminobenzidin erzeugt wurde. Das läßt die Schlußfolgerung zu, daß sich in diesen Zellabschnitten konzentriert Hämoglobin befindet. Diese Vermutung ist allerdings nicht zu erwarten gewesen. Zur weiteren Analyse erfolgten elektronenmikroskopische Untersuchungen von Erythrozyten.

Die eumorphen Formen zeigten in diesen Präparaten konkave, konvexe und runde Strukturen, wie sie auch im Lichtmikroskop zu sehen waren. Die homogene Färbung ist deutlich zu erkennen, siehe Abbildung 18 b. Bei den dysmorphen Zellen wurde ein schmaler Randsaum, der in den Bereichen der Zapfen verdickt war, festgestellt. Die Abbildung 18 a zeigt einen solchen Erythrozyten. Es ist erkennbar, daß der Exozapfen angeschnitten und der periphere Anteil im Bereich des rechten oberen Bildrandes als separate kugelförmige Struktur sichtbar ist. Auch bei diesem Erythrozyten ist sowohl im Bereich des Randsaums als auch des Exozapfens eine homogene Färbung abzulesen.



a.)



b)

Abbildung 18: elektronenmikroskopische Aufnahme, 12000-fache Vergrößerung

- a) dysmorpher Erythrozyt, Befund der Patientin K.D., 42 Jahre, mit einer IgA-Nephropathie, (Präparat 2)
- b) eumorpher Erythrozyt, Befund des Patienten H.M., 56 Jahre, mit einem Blasentumor, (Präparat 5)

4.2. KREISDURCHMESSER UND MITTLERE OPTISCHE DICHTEN ALS SPEZIFISCHE MERKMALE DER ERYTHROZYTEN

4.2.1. VERGLEICH DER PARAMETER KREISDURCHMESSER UND MITTLERE OPTISCHE DICHTEN DER ERYTHROZYTEN IN DEN VERSCHIEDENEN UNTERSUCHUNGSGRUPPEN

Insgesamt erfolgte die Untersuchung von 12.145 Erythrozyten, siehe Abschnitt 3.4.3. Es wurde jeweils der Kreisdurchmesser als ein Maß für die Größe der Zellen sowie der Mittlere Grauwert bestimmt. Letzterer spiegelt die Kontrastierung der Erythrozyten nach der Diaminobenzidinfärbung wider und dient der Berechnung der Mittleren Optischen Dichte, die den Hämoglobingehalt jeder einzelnen Zelle charakterisiert.

Die Mittelwerte für Kreisdurchmesser, Mittleren Grauwert und Mittlere Optische Dichte von jedem Dauerpräparat können den Tabellen 15 a –f auf den Seiten 73 bis 78 entnommen werden.

Aus den durchschnittlichen Werten der Kreisdurchmesser und der Mittleren Optischen Dichte der einzelnen Dauerpräparate wurden nun die Mittelwerte dieser Parameter für die Untersuchungsgruppen gebildet. Die Zusammenfassung der Ergebnisse erfolgt in Tabelle 10.

Untersuchungsgruppen	Anzahl der Patienten	Mittlere Optische Dichte, $\xi \pm s$	Kreisdurchmesser $\xi \pm s$ in μm
Vergleichsgruppe 1	50	$0,5050 \pm 0,071$	$8,0079 \pm 1,133$
Vergleichsgruppe 2	50	$0,4999 \pm 0,071$	$7,7253 \pm 1,093$
Pat.mit Urolithiasis	48	$0,5269 \pm 0,075$	$7,2231 \pm 1,043$
Pat.mit mal.Tumoren	39	$0,5135 \pm 0,082$	$7,4941 \pm 1,200$
Pat.mit ben.Tumoren	11	$0,5126 \pm 0,155$	$7,7259 \pm 2,329$
Pat.mit Glomerulonephritis	50	$0,2731 \pm 0,039$	$6,3606 \pm 0,899$

Tabelle 10: Darstellung der Mittelwerte von Mittlerer Optischer Dichte und Kreisdurchmesser der Erythrozyten in den verschiedenen Untersuchungsgruppen

Zum statistischen Vergleich wurde der KRUSKAL-WALLIS-TEST sowie der MANN-WHITNEY-U-TEST unter Anwendung des Software-Programms SPSS der SPSS Cooperation USA herangezogen.

Die Meßwerte der Mittleren Optischen Dichten der Erythrozyten in den Vergleichsgruppen 1 und 2 sind nahezu identisch. Signifikante Unterschiede sind allerdings bei den Werten des Kreisdurchmessers der Zellen festzustellen ($p = 0,001$). Die Erythrozyten der Vergleichsgruppe 2 sind deutlich verkleinert. Der Mittelwert der Kreisdurchmesser dieser Gruppe beträgt $7,73 \mu\text{m}$, wobei die Präparate 8, 11 und 38 sogar Verringerungen bis in die Größenordnung $< 6,7 \mu\text{m}$ aufweisen.

Es wird deutlich, daß bereits allein der Urinkontakt Veränderungen der Größe der Zellen bewirkt.

Betrachtet man die Mittlere Optische Dichte der Erythrozyten der Gruppe mit Urolithiasis, der Gruppen der benignen und malignen Tumoren sowie der Referenzgruppe, sind keine signifikanten Unterschiede nachweisbar, siehe auch Abbildung 19 a.

Die Erythrozyten im Urin bei Patienten mit Urolithiasis und malignen Tumoren weisen aber bei der Gegenüberstellung mit der Vergleichsgruppe 1 geringere Werte des Kreisdurchmessers auf. Die signifikanten Unterschiede betragen im Mittel bei Urolithiasis $0,78 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$) bei den malignen Tumoren $0,51 \mu\text{m}$ ($p < 0,05$). Der Mittelwert des Kreisdurchmessers in der Gruppe benigner Tumoren ist nahezu identisch mit dem der Vergleichsgruppe 2, in welcher die Erythrozyten aus dem Venenblut einem dreistündigen Urinkontakt ausgesetzt waren. Dieser Wert unterscheidet sich von dem der Referenzgruppe damit ebenfalls um $0,28 \mu\text{m}$. Aufgrund der geringeren Fallzahl konnte allerdings kein signifikanter Unterschied herausgearbeitet werden. Eine graphische Darstellung erfolgt in Abbildung 19 b.

Die deutlichsten Veränderungen der Untersuchungsparameter weisen die dysmorphen Erythrozyten bei den Patienten mit einer Hämaturie glomerulärer Genese auf.

In den Abbildungen 19 a und b ist ersichtlich, daß sowohl der Kreisdurchmesser als auch die Mittlere Optische Dichte deutlich vermindert sind. Die Werte für die Mittlere Optische Dichte sind im Gegensatz zur Vergleichsgruppe 1 nahezu halbiert, Mittelwert = $0,2731$ versus $0,5050$, und unterscheiden sich damit signifikant ($p < 0,05$).

Ebenfalls die Kreisdurchmesser der dysmorphen Erythrozyten sind deutlich verkleinert. Der Mittelwert der Gruppe mit glomerulärer Hämaturie ist $1,64 \mu\text{m}$ niedriger als der der Vergleichsgruppe 1 ($8,00 \mu\text{m}$ zu $6,36 \mu\text{m}$). Der Unterschied ist signifikant ($p < 0,05$).

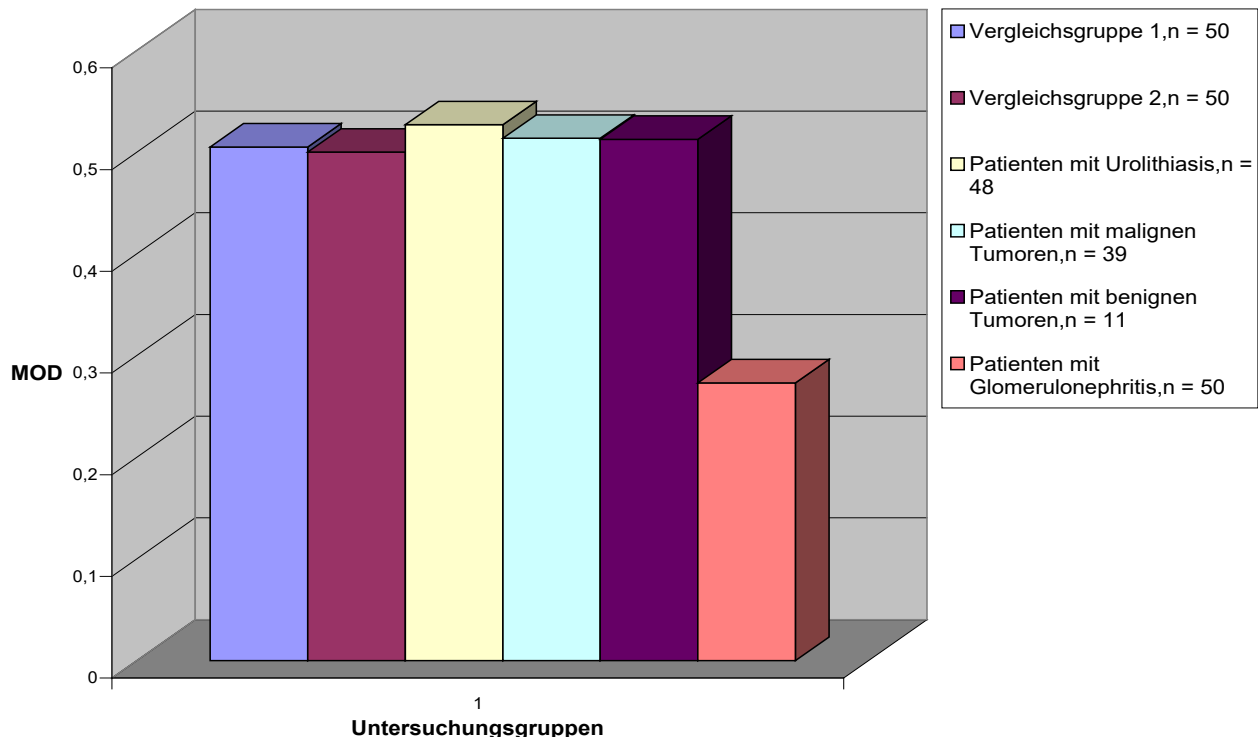


Abbildung 19 a: Mittlere Optische Dichte (MOD) der Untersuchungsgruppen

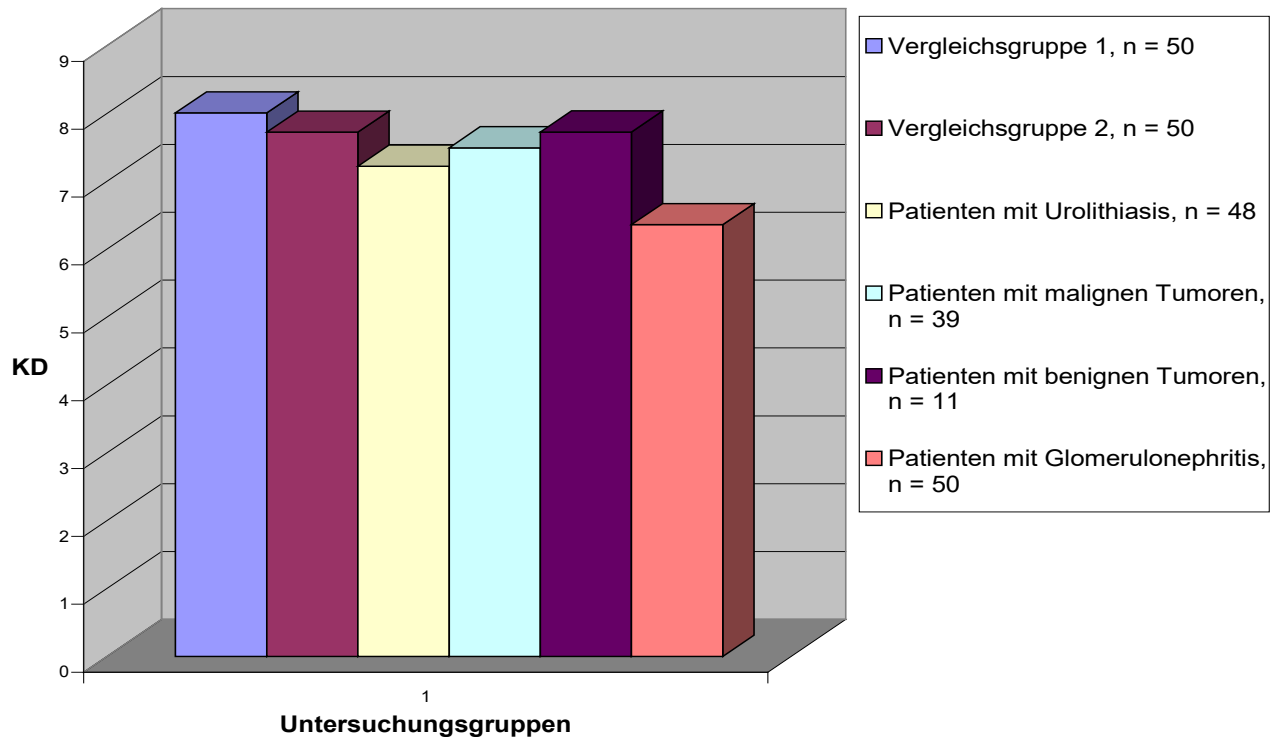


Abbildung 19 b: Kreisdurchmesser (KD) der Untersuchungsgruppen

Die Meßergebnisse der eumorphen Erythrozyten der Gruppen mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese wurden mit denen der dysmorphen Zellen bei glomerulärer Hämaturie verglichen. Unter Anwendung des MANN-WHITNEY-U-TESTES konnten dadurch weitere Untersuchungsergebnisse gewonnen werden:

Signifikante Unterschiede bei der Betrachtung der Mittleren Optischen Dichte wurden zwischen der Referenzgruppe und der Gruppe mit Hämaturie glomerulärer Genese ($p < 0,05$) sowie zwischen der Gruppe mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese und der Gruppe Hämaturie glomerulärer Genese ($p < 0,05$) nachgewiesen.

Bei der Betrachtung des Kreisdurchmesser waren signifikante Unterschiede zwischen der Referenzgruppe, der Gruppe Hämaturie nichtglomerulärer Genese sowie der Gruppe Hämaturie glomerulärer Genese vorhanden (jeweils $p < 0,05$).

Aus diesen Ergebnissen sind folgende Aussagen abzuleiten:

1. Die Kreisdurchmesser von Erythrozyten aus dem Venenblut sind im Vergleich zu denen der Erythrozyten im Urin bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese deutlich vergrößert.
2. Die Kreisdurchmesser von Erythrozyten aus dem Venenblut sind im Vergleich zu denen der Erythrozyten im Urin bei Hämaturie glomerulärer Genese deutlich vergrößert.
3. Die Kreisdurchmesser von Erythrozyten im Urin bei Hämaturie glomerulärer Genese sind deutlich kleiner als die bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese.

Die Mittlere Optische Dichte spiegelt den Hämoglobingehalt der Erythrozyten wider. Nach den Ergebnissen ist feststellbar, daß die Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer Genese weniger Hämoglobin als die Erythrozyten aus dem Venenblut, aber auch weniger als die Erythrozyten bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese besitzen.

Im Rahmen der weiteren Untersuchungen sollte analysiert werden, inwieweit in den verschiedenen Untersuchungsgruppen direkte Abhängigkeiten zwischen Mittlerer Optischer Dichte und Kreisdurchmesser bestehen und ob dabei Unterschiede zwischen den Gruppen festzustellen sind. Hierzu wurden Streudiagramme angefertigt, in welche die genannten Parameter jedes Präparates der entsprechenden Untersuchungsgruppe eingingen. Es fand jeweils ein Vergleich mit der Referenzgruppe statt. Das Bestimmtheitsmaß R_{sq} beschreibt die Anpassungsgüte der Punktwolke an die Regressionsgerade bzw. wieviel Prozent der Varianz der beobachteten y-Werte durch die Regressionsgrade erklärt wird. Weist das Bestimmtheitsmaß Werte gegen Null auf, bestehen keine Abhängigkeiten der untersuchten Parameter Mittlere Optische Dichte und Kreisdurchmesser voneinander. Wurden Werte nahe bzw. gleich Eins berechnet, kann von der einen Variablen auf die andere geschlossen werden.

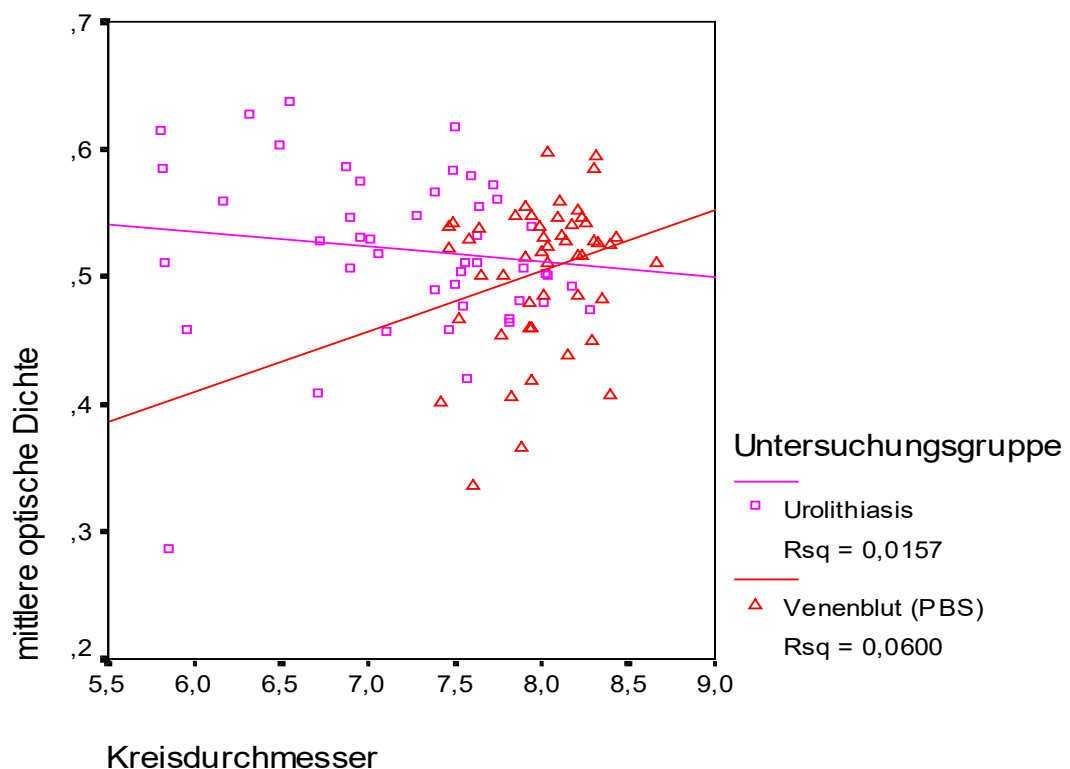


Abbildung 20 a: Darstellung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers von den Erythrozyten der Gruppe mit Urolithiasis sowie der Referenzgruppe

Im Diagramm 20 a ist zu erkennen, daß die Punktwolken beider Untersuchungsgruppen weit um die Regressionsgerade streuen. Die Bestimmtheitsmaße- R_{sq} weisen niedrige Werte auf. Somit ist keine Abhängigkeit der Mittleren Optischen Dichte vom Kreisdurchmesser nachweisbar.

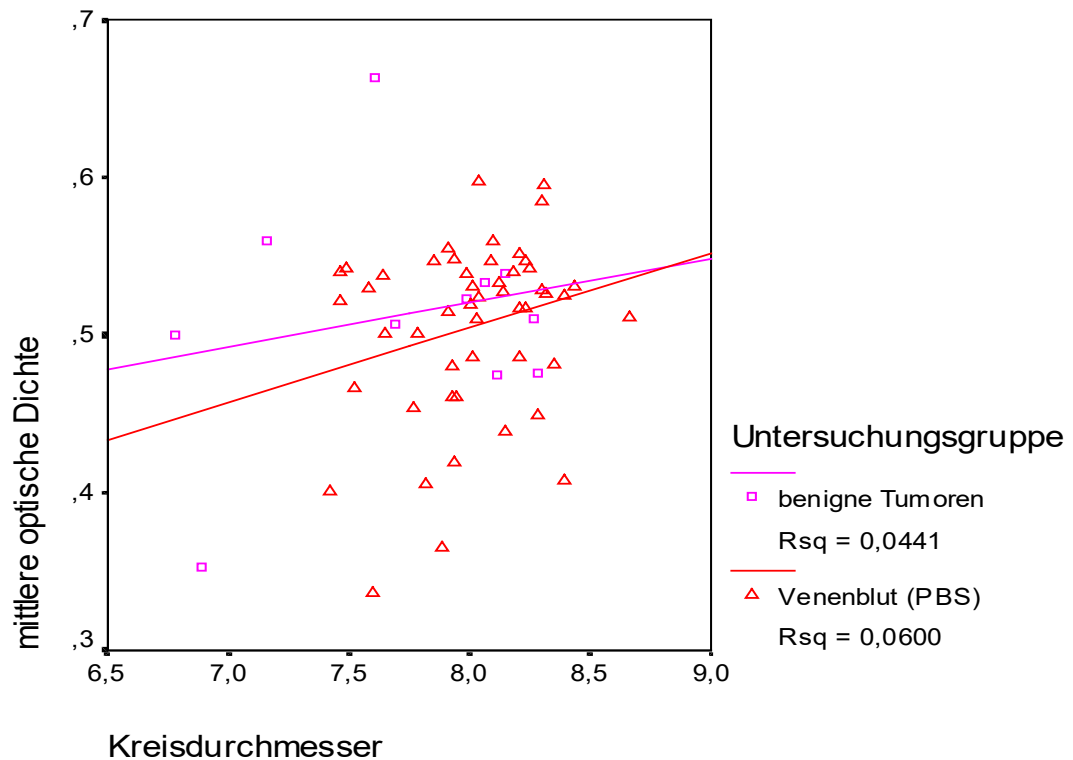


Abbildung 20 b: Darstellung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers von Erythrozyten der Gruppe mit benignen Tumoren sowie der Referenzgruppe

Bei der Betrachtung der Gruppen mit benignen und malignen Tumoren wurden ebenfalls niedrige Bestimmtheitsmaße errechnet, siehe Abbildungen 20 b und c. Zusammenhänge zwischen Mittlerer Optischer Dichte und Kreisdurchmesser der Erythrozyten bestehen somit nicht.

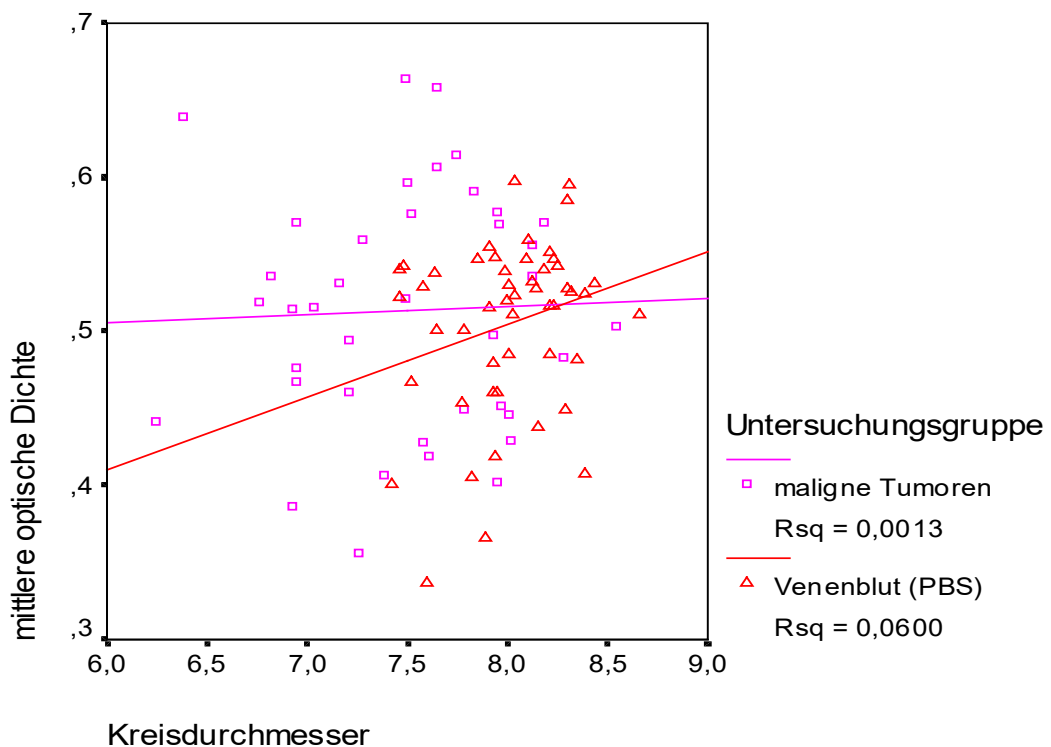


Abbildung 20 c: Darstellung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers von Erythrozyten der Gruppe mit malignen Tumoren sowie der Referenzgruppe

Bei Betrachtung der Streudiagramme der Abbildung 20 a-c ist zu erkennen, daß sich die Punktwolken bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese weitgehend mit denen der Referenzgruppe überlagern. Lediglich in der Gruppe Urolithiasis fallen Werte eines verringerten Kreisdurchmessers im Vergleich zur Referenzgruppe auf ($7,2231\mu\text{m}$ versus $8,0079\mu\text{m}$). Bei der Hämaturie glomerulärer Genese ist dagegen eine relativ deutliche Trennung der Punktwolken im Vergleich zur Referenzgruppe zu sehen, siehe Abbildung 20 d. Ein deutlicher Abfall des Kreisdurchmessers und der Mittleren Optischen Dichte, der statistisch gesichert wurde, ist erkennbar.

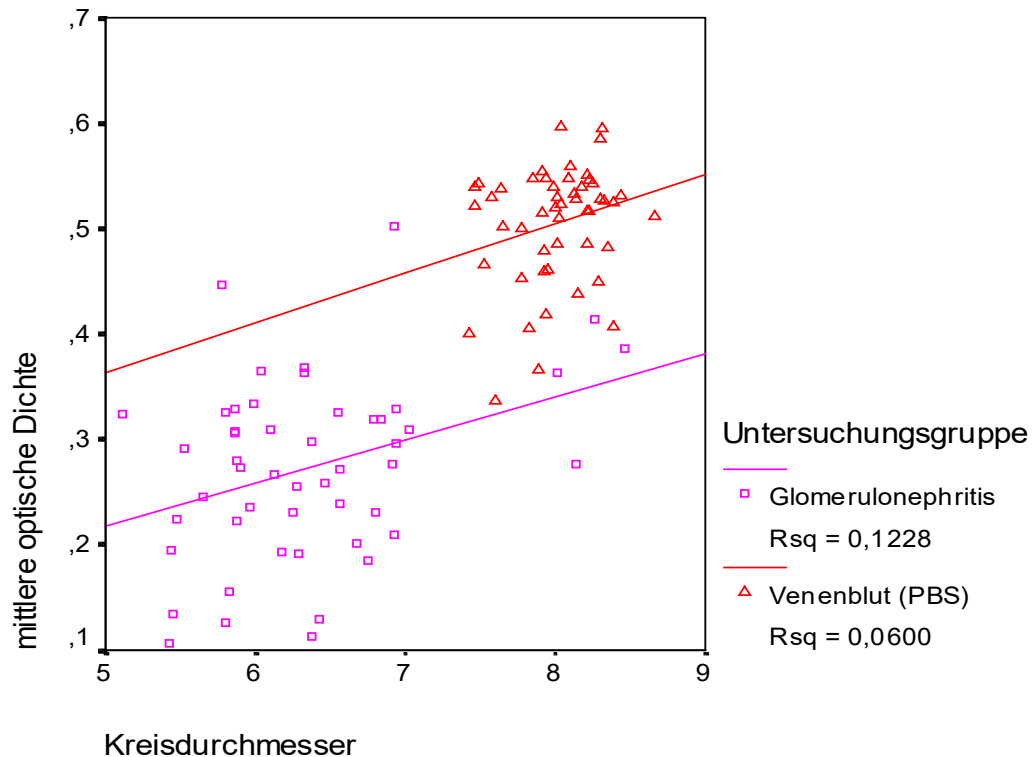


Abbildung 20 d: Darstellung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers von Erythrozyten der Gruppe mit Glomerulonephritis sowie der Referenzgruppe

Durch die abweichende Anordnung der Punktwolken bei Hämaturie glomerulärer und nichtglomerulärer Genese im Vergleich zur Referenzgruppe ergibt sich die Frage, ob diese Unterschiede signifikant sind. Aus diesem Grund erfolgte die Anwendung der Kanonischen Diskriminanzfunktion. Mit Hilfe dieser statistischen Methode kann herausgefunden werden, welche bzw. ob vorhandene Merkmale geeignet sind, zwei oder mehrere Gruppen zu trennen. Sowohl die Mittelwerte der Mittlere Optische Dichte als auch des Kreisdurchmessers der einzelnen Untersuchungspräparate gingen in die Berechnungen ein. Die Fälle mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese ($n = 97$), wurden denen einer Hämaturie glomerulären Genese ($n = 50$), gegenübergestellt, siehe Tabelle 11.

Untersuchungsgruppe	n =	Mittlere Optische Dichte	Kreisdurchmesser in μm
Hämaturie nichtglomerulärer Genese	97	$0,517 \pm 0,07$	$7,389 \pm 0,63$
Hämaturie glomerulärer Genese	50	$0,273 \pm 0,09$	$6,361 \pm 0,73$

Tabelle 11: Darstellung Mittlere Optische Dichte und Kreisdurchmesser der Gruppen Hämaturie glomerulärer und nichtglomerulärer Genese

Zwischen den Mittelwerten der Diskriminanzfunktion der Gruppen Hämaturie nichtglomerulärer Genese bzw. glomerulärer Genese konnte ein signifikanter Unterschied nachgewiesen werden ($p < 0,05$).

Eine Qualitätskontrolle dieser statistischen Methode erfolgte mittels der Kreuzvalidierung. Dabei wurden die Werte der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers von jedem Präparat der Kanonischen Diskriminanzfunktion dieser Parameter von allen anderen Präparaten gegenübergestellt. Bei dem Test betrug der Anteil der richtig erkannten eumorphen Erythrozyten 95,9 %, der Anteil der richtig erkannten dysmorphen Zellen betrug 90 %. Insgesamt konnten 93,9 % der Präparate korrekt in die beiden Gruppen klassifiziert werden, siehe Abbildung 21.

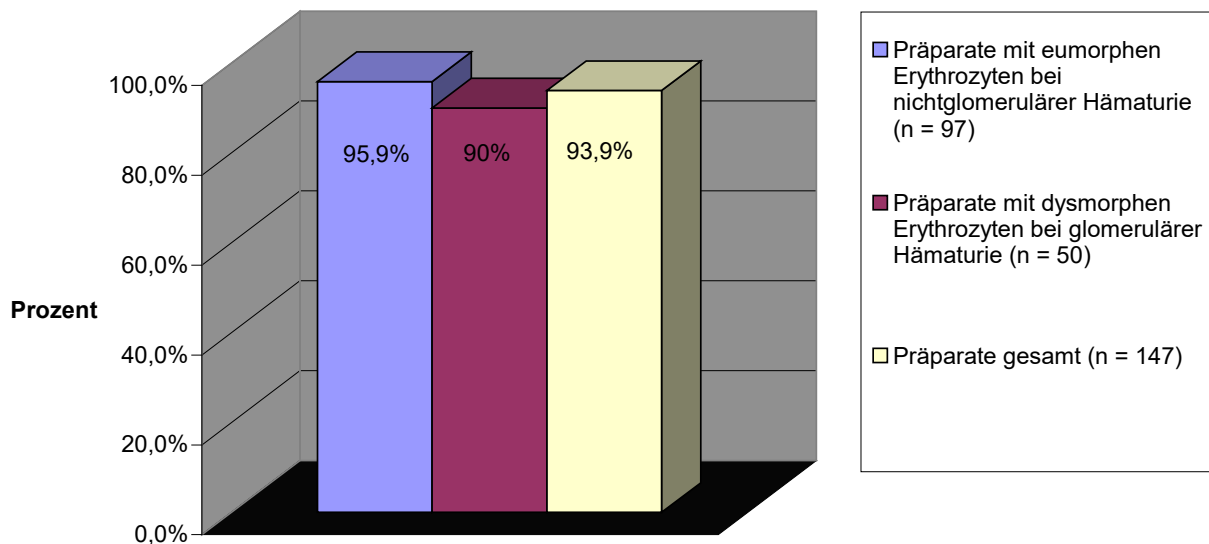


Abbildung 21: Treffsicherheit der Differenzierung von Präparaten mit eumorphen und dysmorphen Erythrozyten mittels Kreuzvalidierung nach Bestimmung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers der Zellen

Aus den Ergebnissen können folgende Schlußfolgerungen abgeleitet werden:

1. Direkte Zusammenhänge zwischen Mittlerer Optischer Dichte und Kreisdurchmesser der dysmorphen Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer Genese sind nicht vorhanden.
2. Direkte Zusammenhänge zwischen Mittlerer Optischer Dichte und Kreisdurchmesser der eumorphen Erythrozyten bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese sind nicht vorhanden.
3. Betrachtet man den Hämoglobingehalt und den Kreisdurchmesser der einzelnen Erythrozyten gemeinsam, sind mit Hilfe der Diskriminanzanalyse Unterschiede zwischen eumorphen und dysmorphen Zellen nachweisbar.
4. Bei Anwendung der Kreuzvalidierung war es durch die Betrachtung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers möglich, 93,9 % der 147 Präparate der richtigen Untersuchungsgruppe, also der Gruppe mit Hämaturie glomerulärer bzw. nichtglomerulärer Hämaturie zuzuordnen.

4.2.2. ABHÄNGIGKEIT DER MITTLEREN OPTISCHEN DICHT UND DES KREISDURCHMESSERS DER ERYTHROZYTEN VOM ANTEIL DYSMORPHER ERYTHROZYTEN IM URINSEDIMENT BEI GLOMERULÄRER HÄMATURIE

Im Versuchsablauf wurde vor Anfertigung der Dauerpräparate der Anteil dysmorpher Erythrozyten im Urinsediment bei den Fällen mit Hämaturie glomerulärer Genese bestimmt. Von den 50 untersuchten Urinen fanden sich in 19 Fällen weniger als 70 % dysmorphe Zellen.

Es erfolgte die Einteilung in eine Gruppe mit mehr als 69 % und zum anderen in Fälle mit weniger als 70 % dysmorpher Erythrozyten im Urinsediment. Die Mittlere Optische Dichte und der Kreisdurchmesser der Zellen beider Gruppen wurden mittels MANN-WHITNEY-U-TEST verglichen, siehe Tabelle 12.

Anteil dysmorpher Erythrozyten im Sediment	n =	Mittlere Optische Dichte		Kreisdurchmesser	
< 70 %	21	0,264 ± 0,02	p=0,498	6,610 ± 0,79	p=0,032
≥ 70%	29	0,279 ± 0,02		6,180 ± 0,64	

Tabelle 12: Mittlere Optische Dichte und Kreisdurchmesser bei unterschiedlichem Anteil dysmorpher Erythrozyten im Sediment

Bei der Betrachtung des Kreisdurchmessers fällt auf, daß sich beide Gruppen signifikant unterscheiden ($p = 0,032$). Bei der Betrachtung der Mittleren Optischen Dichte trifft dies nicht in gleicher Weise zu ($p = 0,498$).

4.2.3. EINFLUSS VON KREATININ UND HARNSTOFF AUF DIE MITTLERE OPTISCHE DICHT UND DEN KREISDURCHMESSER DER ERYTHROZYTEN BEI GLOMERULÄRER HÄMATURIE

Um einen Einfluß von Kreatinin und Harnstoff auf die Mittlere Optische Dichte und den Kreisdurchmesser der Erythrozyten zu erfassen, wurden jeweils zwei Gruppen mit einem Harnstoffwert kleiner/gleich und größer 8,4 mmol/l sowie einem Kreatininwert kleiner und größer/gleich 150 µmol/l gebildet. Die bei diesen Untersuchungen festgelegten Grenzwerte orientierten sich beim Serumharnstoff auf die Obergrenze des Normalwertes. Die Festlegung des Grenzwertes bei der Betrachtung in Abhängigkeit vom Serum-Kreatinin erfolgte so, daß bei deutlich eingeschränkter Nierenfunktion zumindest eine Fallzahl von 8 Untersuchungspersonen erreicht wurde. In der Tabelle 13 sind die den Gruppen zugehörigen Mittleren Optischen Dichten und die Kreisdurchmesser ersichtlich.

Serumwerte	n =	Mittlere Optische Dichte		Kreisdurchmesser	
Kreatinin < 150 µmol/l	42	0,262 ± 0,01	p=0,014	6,309 ± 0,10	p=0,606
Kreatinin ≥ 150 µmol/l	8	0,332 ± 0,02		6,628 ± 0,35	
Harnstoff ≤ 8,4 mmol/l	37	0,260 ± 0,02	p=0,036	6,298 ± 1,15	p=0,296
Harnstoff > 8,4 mmol/l	13	0,309 ± 0,02		6,537 ± 0,23	

Tabelle 13: Mittlere Optische Dichte und Kreisdurchmesser bei entsprechenden Serumwerten

Durch die Vergleiche mit dem MANN-WHITNEY-U-TEST konnten folgende Beziehungen festgestellt werden:

- die Mittlere Optische Dichte und somit der Hämoglobingehalt der dysmorphen Erythrozyten sind bei Kreatininwerten $\geq 150 \mu\text{mol/l}$ im Serum signifikant erhöht ($p = 0,014$),
- bei Harnstoffkonzentrationen größer $8,4 \text{ mmol/l}$ im Serum besitzen die dysmorphen Erythrozyten ebenfalls eine größere Mittlere Optische Dichte und somit auch einen erhöhten Hämoglobingehalt ($p = 0,036$),
- Unterschiede der Kreisdurchmesser in Abhängigkeit der Kreatinin- und Harnstoffspiegel konnten nicht festgestellt werden.

5. DISKUSSION

Die Hämaturie tritt bei sehr unterschiedlichen Erkrankungen auf. Differentialdiagnostisch kommen glomeruläre, tubulointerstitielle, hereditäre Nierenerkrankungen, Gefäßprozesse, Tumoren, Erkrankungen des Nierenbeckens und des Harnleiters sowie der Blase, Prostata und Urethra in Betracht. Aber auch Erkrankungen mit Störungen der Plättchenfunktion bzw. der Gerinnung sind möglich (33).

Nephrologische und urologische Erkrankungen besitzen bei Patienten mit einer Hämaturie aufgrund der Häufigkeit, des Verlaufs und ihrer Prognose eine wesentliche Bedeutung.

Zur Differenzierung zwischen einer Glomerulonephritis, den Tumoren und Entzündungen der ableitenden Harnwege sowie einer Urolithiasis sollten vor invasiven Untersuchungsverfahren die nichtinvasiven Möglichkeiten zur Diagnosesicherung ausgenutzt werden (36).

Nach Untersuchungen von BIRCH und FAIRLEY im Jahre 1979 ist der mikroskopischen Beurteilung von Erythrozyten zur Differenzierung in glomeruläre bzw. nichtglomeruläre Hämaturie ein besonderer Stellenwert einzuräumen (7). Zahlreiche Studien, u.a. von THIEL (138), TOMITA und KITAMOTO (76, 141), FÜNFSTÜCK (35, 37), HALBHUBER (50, 54), SCHUSTER (121) und SCHRAMEK (116), MOURADION und SHERMAN (91) sowie KUBOTA (83), zeigten, daß durch eine morphologische Beurteilung der Erythrozyten im Urin Hinweise auf den Ursprung einer Hämaturie zu finden sind.

Dysmorphe Formen der Erythrozyten weisen typische Veränderungen auf. Die Zellen sind charakteristisch deformiert und treten als Ringformen, Zwergformen sowie mit unterschiedlichen Membranvesikulationen auf. Insbesondere Ringformen mit Außenzapfen, sogenannte Akanthozyten, weisen auf eine glomeruläre Erkrankung hin (34, 37, 138). Weitere Merkmale dysmorpher Erythrozyten sind die Hämoglobinverarmung und Membranfaltung der Zellen (21). Über Ursachen und Mechanismen, die für die Entstehung derartiger Zellveränderungen verantwortlich sind, existieren verschiedene Theorien. Durch alleinigen Kontakt von Erythrozyten mit Flüssigkeiten unterschiedlicher Osmolaritäten bzw. den Einfluß lysosomaler Enzyme ist es nicht möglich, die charakteristischen Merkmale in vitro zu erzeugen. Zahlreiche Versuche hierzu wurden durchgeführt (52, 58, 114). SCHRAMEK (114) gelang es in vitro, typisch dysmorphe Membranveränderungen in einem hämolytischen Milieu nach vorheriger osmotischer Schädigung der Zellen hervorzurufen.

Hohe Vesikulationsraten und zum Teil Zellfragmentationen von Erythrozyten aus Venenblut nach Einflüssen wie mechanischem Streß, Wärmebehandlung und Inkubation mit Harnstoff wurden von HALBHUBER et al. (49) beschrieben. Grundlage dieser Schädigungsmechanismen sind Membrangefügestörungen, welche durch die Reduzierung von Membranskelettproteinen auftraten. Eine zunehmende Aktivierung der Acetylcholinesterase sowie eine gesteigerte Bindung von IgG konnten nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen wurden spektrophotometrisch und ultrahistochemisch durchgeführt (49).

Die Ansicht, daß Membranalterationen durch Störungen des inneren und äußeren zellulären Milieus erreicht werden, wird von NICOLSON (96) vertreten. Hierbei erfolgen Strukturveränderungen des Plasmalemmas durch hydrolytische Enzyme wie Neuramidasen und Proteasen sowie Fixantien wie Aldehyde und Diimidoester. Weitere Einflüsse besitzen die Variation der Ionenstärke, des pH-Wertes und der Osmolarität, welche eine Änderung des Ligandenbindungsverhaltens und somit der Permeabilität der Erythrozytenmembran hervorrufen. Auch bewirken Membranveränderungen eine herabgesetzte Formelastizität, welche bei der Passage der Zellen durch die Kapillaren zur druckinduzierten Abschnürung von Mikrovesikeln führt. Die Folgen derartiger Strukturveränderungen äußern sich in einer Verschlechterung des rheologischen Verhaltens der Zellen, einer Freisetzung von Membranrezeptoren sowie einer verstärkten Bindung von IgG und Makrophagen an geschädigten Erythrozyten (96). Die Vesikulation stellt eine besondere Form der

Membranschädigung bei Erythrozyten dar. Dabei ist der Proteingehalt in den Vesikelbereichen auf ca. 30 % verringert. Spektrin und Bande-6-Protein fehlen nahezu vollständig, aber membranassoziertes IgG ist reichlich nachweisbar (49, 57, 92).

Abschnitte mit einer hohen IgG-Anlagerung werden vom Reticulo-Histiozytären System erkannt und eliminiert. Mit der Bildung von Exovesikeln erfolgt somit die Ausgliederung geschädigter Membranbezirke, intaktes remodelliertes Plasmalemm verbleibt auf der Restzelle. Auf diese Weise wird der Bestand des an die Membran gebundenen IgG gering gehalten und die vorzeitige Primärelimination verhindert (59).

Treten hauptsächlich eumorphe Erythrozyten im Urin auf, kommt als Ursache der Hämaturie fast ausschließlich eine postrenale Blutungsquelle in Betracht. Die weitere Diagnostik umfaßt die Suche nach einer Erkrankung der ableitenden Harnwege bzw. der männlichen Geschlechtsorgane. Invasive Maßnahmen wie die Zystoskopie und/oder röntgenologische Untersuchungen sind oft unerlässlich.

Beträgt der Anteil dysmorpher Erythrozyten im Urin mehr als 70%, ist dies ein deutlicher Hinweis auf eine glomeruläre Erkrankung. Im Unterschied zum Verdacht auf eine nichtglomeruläre Hämaturie sind im Rahmen der weiteren medizinischen Betreuung dann andere diagnostische sowie therapeutische Schritte notwendig, siehe auch Abschnitt 1.2.3. (24, 35, 37, 116).

Zur Differenzierung in Hämaturie glomerulärer bzw. nichtglomerulärer Genese besitzt die mikroskopische Beurteilung der Morphologie von Erythrozyten im Urinsediment eine wesentliche Bedeutung. Da der prozentuale Anteil dysmorpher Zellen im Verhältnis zur Gesamtzahl der Erythrozyten variiert, ist oftmals bei der Mischhämaturie keine eindeutige Zuordnung in die Gruppen glomeruläre bzw. nichtglomeruläre Hämaturie möglich.

DE SANTO (24) beschreibt Fälle, welche bei einer Rate von 50-70% dysmorpher Zellen im Urinsediment eine renale Tuberkulose, polyzystische Nierendegeneration und Blasensteine aufwiesen. In Studien von FASSETT (28) konnte von 303 Patienten mit Hämaturie durch mikroskopische Untersuchungen bei 253 Patienten eine definitive Diagnose im Sinne einer glomerulären bzw. nichtglomerulären Genese gestellt werden; eine Beurteilung der übrigen Fälle war jedoch nicht möglich. Von SCHUETZ und Mitarbeitern (119) wurde nachgewiesen, daß es bei Diuretikagabe zur deutlichen Reduzierung des prozentualen Anteils dysmorpher Erythrozyten im Urin kommt. Selbst bei nierengesunden Personen fanden MÜLLER et al. (93) eine Erythrozyturie mit bis zu 18 % dysmorpher Zellen. Wie auch von ROTH (108) beschrieben, kommt es physiologisch zur glomerulären Passage von Erythrozyten in den Urin. Mechanische Verformungen im Bereich der glomerulären Basalmembran, osmotische Schwankungen und lysosomatische Membranschädigungen im Tubulussystem können auftreten und so die Verformung der Zellen erklären.

Zur genaueren Klärung der Genese einer Hämaturie und zur Einleitung der erforderlichen Therapie ergibt sich die Notwendigkeit der weiteren Charakterisierung der Erythrozyten im Urinsediment. Zu diesem Zweck erfolgten Untersuchungen an dysmorphen und eumorphen Erythrozyten bei einer Hämaturie glomerulärer bzw. nichtglomerulärer Genese sowie an Zellen aus dem Venenblut.

Ziel der Auswertung war die Differenzierung von eumorphen und dysmorphen Zellen durch die Beurteilung deren Morphologie, des Kreisdurchmessers und des Hämoglobingehaltes. Vergleiche dieser Erythrozyteneigenschaften bei einer Hämaturie glomerulärer und nichtglomerulärer Genese wurden hergestellt. Weiterhin erfolgte die Untersuchung an Zellen aus dem Venenblut mit bzw. ohne vorheriger Urininkubation. Durch diese Eingliederung zusätzlicher Vergleichsgruppen in den Untersuchungsaufbau sollten Informationen über Schädigungsmechanismen an den Erythrozyten gewonnen werden.

Empfehlungen über die Zentrifugationstechnik zur Gewinnung eines Urinsedimentes unterscheiden sich beträchtlich. Urinvolumen von 3 bis 20 ml, Zentrifugationszeiten zwischen 3 und 10 min und Drehzahlen von 1000 bis 3000 U/min werden beschrieben. Angaben zur Beschleunigung reichen von 183 bis 750•g (30, 37, 114, 119, 121, 138).

Um die Erythrozyten aus den Urinsedimenten genau untersuchen und anschließend vergleichen zu können, war es notwendig, so viele Zellen wie möglich im Dauerpräparat zu fixieren. Eine weitere Voraussetzung zur Messung des Hämoglobingehaltes und des Kreisdurchmessers bestand darin, den Hintergrund im mikroskopischen Bild frei von anderen Urinbestandteilen zu halten. Es wurden Versuchsreihen mit unterschiedlichen Zentrifugationsbedingungen gebildet und Dauerpräparate angefertigt. Nach der mikroskopischen Betrachtung erwies es sich als sinnvoll, zur Präparateherstellung eine fünfminütige Zentrifugation von 10 ml Urin bei einer Drehzahl von 2000 Umdrehungen pro Minute zu wählen. So konnten viele Erythrozyten vor einem homogenen hellen Hintergrund ausgewertet werden.

Die Mittlere Optische Dichte der Erythrozyten stellt ein Maß für den Hämoglobingehalt der Zellen dar. Nach THIEL (138) ist die Hämoglobinverarmung ein typisches Merkmal von dysmorphen Erythrozyten. Zur Bestimmung der Mittleren Optischen Dichte sowie des Äquivalenten Kreisdurchmessers wurden eumorphe und dysmorphe Zellen im DMR/BE-Mikroskop der Firma Leica markiert. Anschließend fand die computergestützte Messung der genannten Parameter statt. Dazu war es notwendig, Dauerpräparate, in denen die Erythrozyten fixiert sind, anzufertigen. Eine weitere Voraussetzung zur Messung des Hämoglobingehaltes war dessen Anfärbung in der Zelle. Als Färbemittel für das Hämoglobin wurde das Diaminobenzidin verwendet. Bereits BARTL (4) hatte in Versuchsreihen festgestellt, daß dieses als Chromogen einen stärkeren Kontrast als Paraphenylendiamin-Pyrocatechol erzeugt und somit eine bessere Beurteilung der Zellen möglich ist. Das Hämoglobin fungiert bei dieser Pseudoperoxydasereaktion als Katalysator und erfährt eine irreversible Veränderung. Im Lichtmikroskop wird eine Braunfärbung des Erythrozyten sichtbar, welche im DMR/BE-Mikroskop gemessen wurde. Die anderen Zellbestandteile erhielten keine Färbung und gingen somit nicht in die Bestimmung der Mittleren Optischen Dichte ein. Diese spezielle Färb- und Meßmethode unterscheidet sich deutlich von der herkömmlichen Beurteilung von Erythrozyten im Licht- bzw. Polarisationsmikroskop.

Die lichtmikroskopische Auswertung der Erythrozyten fand bei einer Wellenlänge von 551 nm und einer 400-fachen Vergrößerung statt. Das Leitz-Mikroskop ist mit hochwertigen Unendlichlinsen ausgestattet, so daß chromatische Abbildungsfehler vermieden werden. Dies bedeutet, daß alle Wiedergabeebenen farbfehlerfrei dargestellt sind und eine hohe Qualität des mikroskopischen Bildes und somit der Meßergebnisse für die Mittlere Optische Dichte und den Kreisdurchmesser vorliegt (85).

Insgesamt wurden 12.145 Erythrozyten beurteilt. Es bestätigte sich, daß nach Diaminobenzidin-Reaktion und anschließender Untersuchung im Hellfeld-Mikroskop eine sehr gute Beurteilung der Morphologie der Zellen möglich ist. Wie von BARTL (4) beschrieben, zeigten die Präparate mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese farbstarke, runde, glattbegrenzte Erythrozyten, siehe Abbildung 11 (Seite 41). Auch die dysmorphen Formen ließen sich im Mikroskop sehr gut darstellen. Typische Dysmorphiekriterien nach THIEL (138) wie Extrusion und die spezifischen Formveränderungen wie Ringformen, Ringformen mit Exo- oder Endozapfen konnten erkannt werden. Somit war im Rahmen der weiteren Auswertung die Markierung und anschließende computergestützte Messung mit Hilfe des Software-Programms Quantimed 500 gewährleistet.

Bei einer isotonen Urinosmolarität traten in den Gruppen mit einer Hämaturie nichtglomerulärer Genese Stechapfelformen der Erythrozyten auf, siehe Tabelle 14 (Seite 64). Die Mittelwerte der Osmolarität lagen unmittelbar nach der Materialentnahme nicht im Grenzbereich zur hypertonen Lösung, bei welcher eine Entstehung dieser Formen zu erwarten gewesen wäre (138). In den

Präparaten der Gruppe mit Hämaturie glomerulärer Genese wurden keine Stechapfelformen gefunden. Aus diesem Grunde scheint eine Membranschädigung im glomerulären bzw. tubulären Abschnitt als Ursache der Entstehung dieser Zellen unwahrscheinlich. Bedingung zur Verarbeitung des Urins war, daß dieser nicht länger als vier Stunden und bei 4° C gelagert wurde. In den Ausführungen von KEIL und HOFMANN (64, 72) wird verlangt, daß der Urin bei einer Kühlung von 4° C innerhalb von zwei Stunden verarbeitet sein soll. ROTH (108) beschreibt, daß eine hohe autolytische Potenz des Urins bereits nach zwei Stunden besteht und Veränderungen korpuskulärer Bestandteile stattfinden.

Es kann festgestellt werden, daß eine längere Lagerungszeit, die bei den vorliegenden Untersuchungen bis zu vier Stunden betrug, die Ursache für das Auftreten der Stechapfelformen ist.

Genese der Hämaturie	Mittlere Osmolarität bei Präparaten mit Stechapfelform in osmol/l	Mittlere Osmolarität Gesamt in osmol/l
Urolithiasis	0,47	0,523
Maligne Tumoren	0,751	0,644
Benigne Tumoren	0,444	0,606

Tabelle 14: Osmolaritätsbereiche bei Auftreten von Stechapfelformen in den Gruppen der Hämaturie nichtglomerulärer Genese

Von 243 Präparaten konnten die Mittlere Optische Dichte sowie der Kreisdurchmesser von jeweils 50 Erythrozyten bestimmt werden. Lediglich in fünf Fällen mit glomerulärer Hämaturie war dies aufgrund einer verminderten Zellzahl nicht möglich. Es wurden hier nur 31, 46, 15, 22 bzw. 40 Erythrozyten ausgewertet. Weiterhin wiesen die Dauerpräparate der Patienten mit glomerulären Erkrankungen deutlich weniger Zellen pro Gesichtsfeld auf als die der Untersuchungspersonen mit nichtglomerulärer Hämaturie.

Die Reduzierung der Erythrozytenzahl muß im Rahmen der Präparateherstellung, insbesondere bei den Zentrifugationen, aufgetreten sein, denn vor Verarbeitung der Urine war in allen Proben annähernd die gleiche Zellmenge vorhanden, welche mittels Stix-Test ermittelt wurde. Auch aus den Studien von FASSETT, DE SANTO und DE METZ (24, 25, 28) ergibt sich, daß hohe Zentrifugationszeiten von zehn Minuten notwendig sind, um möglichst viel Zellmaterial im Sediment auswerten zu können. SCHUETZ (119) versuchte dies mit einer Beschleunigung von 750•g, SHICHIRI (123) mit einem hohen Urinvolumen zu erreichen. Konsequenterweise erscheinen die Parameter von DE METZ (25), welcher 10 ml Urin zehn Minuten bei einer Beschleunigung von 1.500•g zentrifugiert. Aus den Daten geht hervor, daß im Überstand noch ein beträchtlicher Teil an Zellmaterial vorhanden ist, welchen die Autoren verwerten wollen. Steigt jedoch die Anzahl der Zentrifugationen, gehen mit dem jeweiligen Überstand auch mehr Erythrozyten verloren. Betrachtet man weiterhin, daß die dysmorphen Erythrozyten auf Grund der Hämoglobinverarmung ein geringeres spezifisches Gewicht als eumorphe Zellen besitzen, gelangten bei jeder Zentrifugation im Vergleich zur Gruppe der Patienten mit einer nichtglomerulären Hämaturie weniger Zellen in den Bodensatz. Ein Großteil des Materials verblieb im Überstand. Dieser wurde bei der Herstellung der Dauerpräparate verworfen. Insgesamt waren neun Zentrifugationen zur Beseitigung anderer Urinbestandteile und von Färbe- und Fixierungsmitteln notwendig. Aus diesen Daten ist zu schlußfolgern, daß insbesondere bei der Gruppe mit glomerulärer Hämaturie viele Erythrozyten infolge der Präparateherstellung verloren gingen und letztendlich nicht im DAB-gefärbten Präparat erschienen. Im Rahmen der lichtmikroskopischen Auswertung der Präparate ist auch keine Beurteilung der ursprünglichen Anzahl der Erythrozyten im Patientenurin möglich. In der Literatur konnten zu diesen Ergebnissen keine Angaben gefunden werden. BARTL (4) stellte auch keine Vergleiche zwischen nichtglomerulärer und glomerulärer Hämaturie her und geht in seinen Ausführungen nicht auf Zellverluste im Rahmen der Diaminobenzidin-Färbung ein.

In der Gruppe mit Hämaturie glomerulärer Genese waren im Hellfeld-Mikroskop Zellen zu sehen, die nach der Klassifikation von THIEL (137) den Schatten entsprechen. Diese sind farbschwach, inhomogen und besitzen keine glatte Oberfläche. Eine Messung des Kreisdurchmessers und der Mittleren Optischen Dichte bzw. des Hämoglobingehaltes dieser Zellen ist mit der angewendeten Methode nicht möglich, da selbst nach Färbung der Kontrast zur Beurteilung der Umrisse nicht ausreicht. Schatten sind hämoglobinverarmte Zellen, die somit auch ein niedrigeres spezifisches Gewicht besitzen. Nach Zentrifugation befinden sich noch viele dieser Formen im Überstand. Bei der Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie wurde dieser Überstand weiterverarbeitet. Es ist anzunehmen, daß im Rahmen der elektronenmikroskopischen Untersuchungen in dieser Arbeit häufig eine Beurteilung von Schatten stattfand.

Die dysmorphen Erythrozyten, welche mittels Elektronenmikroskopie untersucht wurden, zeigten die typischen Dysmorphiekriterien wie sie THIEL (138) beschrieben hat. Spezifische Formveränderungen und Extrusionen sowie Membranfaltung waren erkennbar. Im Mikroskop ist ein sehr schmaler Randsaum der Zelle sichtbar, welcher möglicherweise durch den Wasserentzug bei der Präparateherstellung entstanden ist. Die Entwässerung des Untersuchungsmaterials ist bei der Elektronenmikroskopie notwendig. Dies erfolgte durch mehrere Spülungen mit Alkohol unterschiedlicher Konzentration. Die Methode des schnelleren Wasserentzugs durch Azeton wurde nicht gewählt, da hier erhebliche Schrumpfungen der Zellen entstehen und die morphologische Beurteilung im Bereich der Membran und der Vesikel nur eingeschränkt möglich gewesen wäre (138). Der Randsaum der Erythrozyten erscheint deutlich dünner als bei den dysmorphen Zellen im Lichtmikroskop. Im Bereich der Extrusionen ist ein breiter homogen gefärbter, kontrastreicher Zellabschnitt vorhanden, welcher auch bei der lichtmikroskopischen Betrachtung der dysmorphen Formen beobachtet werden konnte. Es kann festgestellt werden, daß die Schatten bei der elektronenmikroskopischen Beurteilung zwar wenig Hämoglobin enthalten, aber morphologisch Ähnlichkeiten mit den im Lichtmikroskop untersuchten kontrastreichereren, dysmorphen Erythrozyten aufweisen. Sie entsprechen somit dysmorphen Zellen, die wesentlich stärker alteriert sind. Die Ergebnisse werden in den Darstellungen der Abbildungen 15 und 18 a auf den Seiten 47 und 51 verdeutlicht.

Bei weiteren Studien über Veränderungen der Ultrastruktur der Erythrozytenmembran ist es wichtig, mehrere Stadien der hämoglobinverarmenden Zelle zu betrachten. Nur so können die Schädigungsmechanismen genauer untersucht werden. Das bedeutet, daß insbesondere bei der Elektronenmikroskopie im Rahmen der Präparateherstellung darauf geachtet werden sollte, daß möglichst viele dysmorphe Erythrozyten, aber nicht nur die von THIEL (138) bezeichneten Schatten, fixiert werden.

Eumorphe Zellen besitzen auch im Elektronenmikroskop ein homogenes Aussehen, diskusförmige Formen sind erkennbar. Morphologische Unterschiede zu den im Lichtmikroskop betrachteten Zellen wurden nicht beobachtet.

Nach DAVID (23) beträgt der Durchmesser eines Erythrozyten im Mittel $7\text{ }\mu\text{m}$. Im Rahmen dieser Untersuchung konnte bei den Vergleichsgruppen und den Gruppen mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese eine Vergrößerung der Kreisdurchmesser festgestellt werden ($\bar{x} = 7,638 \pm 1,36$), siehe auch Tabelle 10 auf Seite 52.

Volumenzunahmen entstehen im hypotonen Urin (138). Bei der Präparateherstellung wurden aber ausschließlich isotone Urine verwendet, um einen Einfluß der Osmolarität möglichst gering zu halten.

Die Erythrozyten aus dem Venenblut der Vergleichsgruppe 1 gesunder Probanden wurden ohne vorherigen Urinkontakt mittels Diaminobenzidin-Reaktion gefärbt und ausgewertet. In dieser Gruppe fällt mit einem Mittelwert $> 8\text{ }\mu\text{m}$ ein besonders hoher Kreisdurchmesser auf. Da der mittlere Erythrozytendurchmesser deutlich größer als $7\text{ }\mu\text{m}$ ist ($p < 0,05$), muß die Vergrößerung auf die Herstellungsmethode der Präparate zurückgeführt werden. Ebenfalls BARTL (4) belegte in

seinen Untersuchungen, daß durch die Herstellungsmethode, insbesondere durch die Diaminobenzidin-Reaktion, eine Vergrößerung der Erythrozyten verursacht wird. Das charakteristische Merkmal der Vergleichsgruppe 2 gesunder Probanden bestand darin, daß die Erythrozyten vor der Färbung mit Diaminobenzidin drei Stunden im Urin gelagert wurden. Diese Methode wurde gewählt, um die Wirkung der Urininkubation auf die Zellen, wie sie auch bei den Gruppen mit glomerulärer und nichtglomerulärer Hämaturie besteht, einschätzen zu können. Bei der Betrachtung der Kreisdurchmesser der beiden Vergleichsgruppen unterscheiden sich die Werte im Mittel um $0,28 \mu\text{m}$ ($p = 0,01$). Die Zellen, die im Urin drei Stunden inkubiert wurden, weisen mit $\bar{x} = 7,725 \pm 1,09$ die geringeren Kreisdurchmesser auf.

Das Ausmaß der Zunahme der Erythrozytendurchmesser ist somit einerseits in der Diaminobenzidin-Reaktion, andererseits im vorher stattgefundenen bzw. nicht stattgefundenen Urinkontakt zu vermuten.

Den niedrigsten Mittelwert des Kreisdurchmessers bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese weisen die Erythrozyten aus dem Urin der Patienten mit Urolithiasis auf. Dieser unterscheidet sich deutlich von den Werten der Patienten mit benignen Tumoren ($p = 0,017$). Von THIEL (138) wird eine Verkleinerung der Erythrozyten bei einer Lagerung nach zwei bis 48 Stunden im hypertonen Urin beschrieben. Im Versuchsaufbau wurde jedoch die Normoosmolarität des Urins gewährleistet. Eine Erklärung für die Reduzierung des Kreisdurchmessers wäre, daß nach dem Wandkontakt der Konkremeente entzündliche Veränderungen im Bereich der Schleimhaut stattfinden. Die dabei freigesetzten Proteasen schädigen die Erythrozytenoberfläche. Bei dem nun folgenden Urinkontakt der Zellen entsteht ein verstärkter Volumenverlust. Auch bei der Entstehung dysmorpher Erythrozyten wird von FÜNFSTÜCK (33) eine initiale Schädigung der Erythrozyten durch den Kontakt mit geschwollenen Endothelzellen, allerdings hier im Bereich der glomerulären Kapillarschlingen, beschrieben. SCHRAMEK (117) und KLINZING (81) erreichten diese Membranstörungen experimentell durch den Einfluß proteolytischer Enzyme auf die Erythrozyten mit anschließender Inkubation der Zellen in Lösungen unterschiedlicher Osmolarität. Es ist zu vermuten, daß Schädigungen der Erythrozytenmembran durch Prostaglandine, Proteasen, Zytokine und reaktive Sauerstoffspezies auch im Bereich des Urothels durch Entzündungen nach Steinkontakten stattfinden können. Da nur eine minimale Verkleinerung des Kreisdurchmessers und keine Änderung der Mittleren Optischen Dichte bzw. des Hämoglobingehaltes auftritt, ist zu vermuten, daß die Veränderungen an der Erythrozytenmembran von deutlich geringerem Ausmaß als bei einer Glomerulonephritis sind. Beim Übertritt der Erythrozyten aus benignen Tumoren in den Urin wären die beschriebenen entzündlichen Reaktionen nicht vorhanden oder nur gering ausgeprägt. Unterschiede der Kreisdurchmesser in den Untersuchungsgruppen mit Urolithiasis und malignen Tumoren konnten gesichert werden.

Die stärkste Verringerung des Kreisdurchmessers weisen dysmorphe Erythrozyten bei einer glomerulären Hämaturie auf. Die Mittelwerte weichen im Vergleich zu denen der anderen Untersuchungsgruppen um $-0,86$ bis $-1,6 \mu\text{m}$ ab. Besonders ausgeprägt ist die Verkleinerung der Zellen bei den Patienten, welche in den mikroskopischen Untersuchungen größer/gleich 70 % dysmorphe Erythrozyten im Urinsediment aufwiesen. Der Unterschied zur Gruppe mit weniger als 70 % dysmorpher Zellen ist signifikant ($p = 0,032$). Bei Patienten mit einer Glomerulonephritis und größer/gleich 70 % dysmorpher Zellen im Urinsediment müssen demzufolge die Schädigungsmechanismen, die auf die Erythrozyten wirken, von besonderer Intensität sein. Gerade in dieser Gruppe scheinen weitere Untersuchungen zur Findung von pathogenetischen Mechanismen der Entstehung dysmorpher Zellen erfolgversprechend. Die Studien könnten bei der Erythrozytencharakterisierung und insbesondere bei der Frage der Differenzierung in glomeruläre bzw. nichtglomeruläre Hämaturie wichtige Hinweise erbringen. Die besondere Bedeutung einer erhöhten Rate dysmorpher Zellen wird auch von FÜNFSTÜCK (37) beschrieben. Nach diesen Studien müssen mindestens 70 % dysmorphe Erythrozyten im

Sediment als Referenzwert für die sichere Annahme einer glomerulären Hämaturie vorhanden sein. Die vorliegende Untersuchung unterstreicht ausführlich, daß bei diesem prozentualen Anteil dysmorpher Zellen im Urinsediment erhöhte pathologisch morphologische Veränderungen vorliegen.

Da in dieser Studie bei den 98 Fällen mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese keine dysmorphen Erythrozyten gefunden wurden, andererseits aber bei Fällen mit nachgewiesener Glomerulonephritis der Anteil dysmorpher Zellen im Urinsediment zum Teil nur 20 % (Präparat 25) bzw. 25 % (Präparat 35) betrug, ist dies ein Indiz dafür, daß bei einem geringen Anteil dysmorpher Erythrozyten im Urin eine beginnende glomeruläre bzw. tubuläre Schädigung vorliegen kann.

Die Mittleren Optischen Dichten und somit die Hämoglobinkonzentration eumorpher Erythrozyten in den Gruppen bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese unterscheiden sich nicht. Auch im Vergleich zu den Werten, die bei den Zellen aus dem Venenblut ohne bzw. mit Urinkontakt gemessen wurden, besteht keine Differenz. Es kann festgestellt werden, daß die Erythrozyten bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese trotz der Urininkubation keine Verringerung des Hämoglobingehaltes erfahren.

Die Werte der Mittleren Optischen Dichte der dysmorphen Zellen in der Gruppe mit glomerulärer Hämaturie sind deutlich verringert, siehe Tabelle 11 (Seite 57). Ein signifikanter Unterschied ist zur Vergleichsgruppe 1 gesunder Probanden, bei der die Erythrozyten aus dem Venenblut ohne vorherigen Urinkontakt gefärbt wurden, nachweisbar ($p < 0,05$). Auch die Mittleren Optischen Dichten der Erythrozyten bei glomerulärer bzw. nichtglomerulärer Hämaturie unterscheiden sich deutlich ($p < 0,05$). Da die Mittlere Optische Dichte ein Maß für den Hämoglobingehalt der Zellen darstellt, konnte nachgewiesen werden, daß die dysmorphen Erythrozyten bei Glomerulonephritis im Vergleich zu den eumorphen Zellen bei nichtglomerulärer Hämaturie eine deutliche Hämoglobinverarmung besitzen. Von THIEL (138) wird die Verringerung des Hämoglobingehaltes als ein typisches Merkmal dysmorpher Erythrozyten gefordert.

Es wurde gezeigt, daß es nach der Färbung von Erythrozyten im Urinsediment mit Hilfe der Diaminobenzidin-Reaktion und anschließender computergestützter Auswertung am DMR/BE Mikroskop der Firma Leica möglich ist, die Hämoglobinverarmung der Zellen rechnerisch zu bestimmen. Dies wurde bereits von BARTL (4) beschrieben und mit Hilfe dieser Arbeit unterstrichen. Somit ist eine sehr gute Differenzierung von eumorphen und dysmorphen Zellen bei einer Hämaturie auf der Grundlage einer computergestützten Meßanalyse möglich.

Bei den Betrachtungen des Hämoglobingehaltes eumorpher und dysmorpher Erythrozyten nichtglomerulärer bzw. glomerulärer Hämaturie sowie der Zellen aus dem Venenblut konnte belegt werden, daß lediglich die dysmorphen Formen weniger Hämoglobin besitzen. Weiterhin wurde erstmals gezeigt, daß nach der Diaminobenzidin-Reaktion neben der Hämoglobinverarmung dieser Zellen auch die Verringerung des Kreisdurchmessers meßbar ist. Die Veränderungen von dysmorphen Erythrozyten aus dem Urin bei Glomerulonephritis sind somit erheblich.

Entzündungsreaktionen, wie sie nach Steinkontakten mit dem Urothel entstehen, bewirken bei weitem keine so ausgeprägte Schädigung der Erythrozyten, es sind in diesen Fällen nur verringerte Kreisdurchmesser nachweisbar, der Hämoglobingehalt der Zellen wird nicht beeinflusst. GIMBEL (44) beschreibt in seinen Ausführungen die Variationsbreite des Durchmessers von Erythrozyten bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese und geht dabei auch auf eine Verringerung bis 5,4 μm im Nativurin ein. Ursachen der Verkleinerung der Zellen werden jedoch nicht erwähnt, eine Differenzierung der Krankheitsbilder erfolgte ebenfalls nicht.

Als Ursache für die erheblichen Veränderungen der Erythrozyten bei glomerulärer Hämaturie werden der ständige Wechsel der Osmolaritäts- und pH-Werte bei der Passage der Zellen durch das Tubulussystem, das Einwirken von lysosomalen Leukozytenenzymen im entzündlich veränderten

Nierenparenchym sowie die mechanische Verformung der Erythrozyten beim Durchtritt durch die strukturell veränderte glomeruläre Basalmembran diskutiert (121). Durch elektronenmikroskopische Untersuchungen des Nierenbiopsiematerials von Patienten mit Glomerulonephritis konnten HALBHUBER und FÜNFSTÜCK (34, 50) geschwollene glomeruläre Endothelzellen, die eine deutliche Reduktion der Gefäßlumina verursachten, feststellen. Erythrozyten besitzen in diesem Nephronabschnitt ein homogenes Aussehen. Sie sind von den Endothelien förmlich eingeschlossen. Im distalen Tubulussystem ist ein aufgelockertes Cytosol und ein abgeschwächter Kontrast der Erythrozyten nachweisbar, was auf Membranschädigungen schließen läßt. Mit Hilfe weiterer Untersuchungen der durch die Toluidblau-Reaktion gefärbten Erythrozyten aus Blut, Urin und Nierenbiopsat konnte nachgewiesen werden, daß bereits im Glomerulus Veränderungen der Membranstruktur beginnen (35). Bereits im Jahre 1984 beschrieben BOHLE und Mitarbeiter (14) entzündliche Aktivitäten im Bereich der Basalmembran, bei der lysosomale Enzyme aus den Podozyten für das Herauslösen von Immunkomplexen aus der Basalmembran und somit für das Entstehen von kompletten und inkompletten Rupturen verantwortlich sind. CLASTER (20) berichtet über Proteasen, welche aus Neutrophilen, aktivierten Monozyten und hydropisch geschwollenen Endothelzellen freigesetzt werden. Er vermutet, daß diese in den Primärharn gelangen und eine Fragmentierung der an der Innenseite der Erythrozytenmembran gelegenen Skelettproteine Spektrin und Bande-3-Protein bewirken. Bei der Passage der Erythrozyten durch das Tubulussystem sind die Zellen Schädigungsmechanismen durch wechselnde Osmolaritätsverhältnisse und pH-Werte sowie der Aktivität löslicher Enzyme ausgesetzt. SCHUETZ und Mitarbeiter (119) gehen von einer Schädigung der Erythrozyten im distalen Tubulus aus. Sie konnten nachweisen, daß sich die Rate der dysmorphen Zellen durch Furosemid- oder wasserinduzierter Diurese signifikant verringert. Diese Ergebnisse deuten auf eine Kombination von Alterationen an der Erythrozytenmembran im Rahmen der Dysmorphogenese. Bereits durch den Kontakt der Zellen mit den geschwollenen Endothelien entsteht eine initiale Schädigung der Erythrozytenmembran. Weitere Alterationen finden dann im Tubulussystem durch die Einwirkung von Harnstoff und die sich verändernden osmotischen Bedingungen und pH-Werte statt (34, 35, 36).

Nach der computergestützten Bestimmung des Kreisdurchmessers und der Mittleren Optischen Dichte, welche den Hämoglobingehalt der Zellen beschreibt, konnte festgestellt werden, daß die dysmorphen Erythrozyten bei den Erkrankungen der Glomerulonephritis im Vergleich zu den eumorphen Zellen bei nichtglomerulärer Hämaturie sowie zu denen im Blut eine Hämoglobinverarmung erfahren haben. Weiterhin ist der Kreisdurchmesser dieser Zellen deutlich verringert. Interessant erschien deshalb die Frage, ob ein Zusammenhang zwischen der Verringerung des Kreisdurchmessers und der Abnahme des Hämoglobingehaltes der Erythrozyten besteht. Eine statistische Methode, um einen solchen Zusammenhang zu beschreiben, ist mit Hilfe der Berechnung des Bestimmtheitsmaßes möglich. Dieses gibt Auskunft darüber, ob durch die Bestimmung eines der beiden Parameter Rückschlüsse auf den zweiten betrachteten Wert möglich sind. Die Skala des Bestimmtheitsmaßes reicht von Null bis Eins. Punktwerte um Eins spiegeln eine Abhängigkeit zweier betrachteter Werte zueinander wider; tendieren die Parameter gegen Null, ist eine Abhängigkeit ausgeschlossen. Bei der Betrachtung der Mittleren Optischen Dichte und somit des Hämoglobingehaltes als auch des Kreisdurchmessers bei dysmorphen Erythrozyten konnte ein Bestimmtheitsmaß von 0,1228 berechnet werden. Obwohl es im Streudiagramm der Abbildung 20 d (Seite 57) den Anschein hat, daß ein Zusammenhang zwischen der Abnahme des Kreisdurchmessers und der Abnahme der Mittleren Optischen Dichte, also des Hämoglobingehaltes, besteht, wurde eine solche Beziehung statistisch ausgeschlossen. Das Bestimmtheitsmaß ist zu niedrig. Das bedeutet, daß die Schädigungsmechanismen, die eine Verringerung des Kreisdurchmessers der Erythrozyten bewirken, nicht im gleichen Maße den Hämoglobingehalt verringern. Es ist anzunehmen, daß für die Abnahme des Hämoglobins und des Kreisdurchmessers der Zellen unterschiedliche Wirkmechanismen bzw. -intensitäten vorhanden sind. Dies unterstreicht die Theorie einer Kombination alterierender Einflüsse bei der

Dysmorphogenese von Erythrozyten. Auch in den Gruppen mit nichtglomerulärer Hämaturie konnte bei den niedrigen Bestimmtheitsmaßen von 0,0441 bei benignen Tumoren, von 0,0013 bei malignen Tumoren und von 0,0157 bei Urolithiasis gezeigt werden, daß eine Abhängigkeit der beiden Parameter Kreisdurchmesser und Mittlere Optische Dichte voneinander nicht besteht und somit durch Bestimmung eines der beiden Werte nicht auf den anderen geschlossen werden kann. Vergleichbare Studien, welche Zusammenhänge von berechneten Werten des Kreisdurchmessers und der Hämoglobinverarmung von dysmorphen und eumorphen Zellen beschreiben, konnten in der Literatur nicht gefunden werden.

Bereits mittels MANN-WHITNEY-U-TEST konnte gezeigt werden, daß die dysmorphen Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer Genese im Vergleich zu den Zellen bei nichtglomerulärer Hämaturie signifikant verkleinerte Kreisdurchmesser und Mittlere Optische Dichten und somit verringerte Hämoglobingehalte besitzen. Dieser Test kommt zur Anwendung, wenn zwei verschiedene Gruppen anhand einer unabhängigen Variablen verglichen werden. Zum weiteren Vergleich von eumorphen und dysmorphen Erythrozyten erfolgte die Anwendung der Diskriminanzanalyse. Mit Hilfe dieser statistischen Methode sollen Werte einer abhängigen oder zu erklärenden Variablen durch die Werte von unabhängigen oder erklärenden Variablen erklärt werden. Charakteristisch für die Diskriminanzanalyse ist dabei, daß die Werte der abhängigen Variablen die Zugehörigkeit zu zwei oder mehr alternativen Teilgruppen, also solchen Teilgruppen, die sich wechselseitig ausschließen, repräsentieren. Weiterhin ist es mit dieser statistischen Methode möglich, Vorhersagen für neue Beobachtungen zu tätigen (17). In dieser Berechnungsgrundlage wurden somit sowohl die Werte der Mittleren Optischen Dichte als auch die des Kreisdurchmessers von insgesamt 7.294 Erythrozyten gemeinsam betrachtet. Jedes dieser spezifischen Erythrozytenmerkmale ging dabei mit einer unterschiedlichen, computergestützt berechneten Wertigkeit in die Berechnungsgrundlage ein. Ein signifikanter Unterschied ($p < 0,05$) zwischen eumorphen und dysmorphen Erythrozyten konnte bewiesen werden. Somit ist es möglich, bei gemeinsamer Betrachtung von Kreisdurchmesser und Mittlerer Optischer Dichte, welche nach Diaminobenzidin-Färbung und Anfertigung von Dauerpräparaten computergestützt errechnet wurden, dysmorphe und eumorphe Zellen mit hoher Sicherheit zu differenzieren.

Die Qualitätskontrolle der Diskriminanzanalyse erfolgte durch die Kreuzvalidierung. Dabei betrug der Anteil der richtig erkannten Präparate mit eumorphen Erythrozyten 95,9 %, der Anteil der richtig erkannten Präparate mit dysmorphen Zellen war mit 90 % ebenfalls sehr hoch. Insgesamt konnten 93,9 % der Dauerpräparate korrekt in eine der beiden Gruppen Hämaturie glomerulärer- bzw. Hämaturie nichtglomerulärer Genese klassifiziert werden. Damit liegt die Aussagefähigkeit der angewendeten Methode im Bereich des Verfahrens der Phasenkontrastmikroskopie, dem eine Sensitivität von über 90% zugeordnet wird (21, 63, 93). Es wurde bereits erwähnt, daß mit Hilfe der Diskriminanzanalyse auch Vorhersagen für weitere Untersuchungen möglich sind. Im speziellen Fall bedeutet das, daß mit Hilfe der Bestimmung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers von diaminobenzidingefärbten Erythrozyten dysmorphe und eumorphe Zellen mit einer 93,9 prozentigen Sicherheit differenziert werden können. Zusätzliche Studien könnten klären, inwieweit mit Hilfe der angewendeten Methode bei einer Hämaturie eine eindeutige diagnostische Voraussage gestellt werden kann, ob es sich um ein urologisches bzw. nephrologisches Krankheitsbild handelt. Dabei sollte frischer Morgenurin möglichst innerhalb von zwei Stunden verarbeitet werden, da nach diesem Zeitraum die autolytische Potenz des Urins Membranschädigungen an den Erythrozyten hervorruft und Veränderungen der Morphologie insbesondere der Größe und der Form entstehen (108). Es ist günstig, Zentrifugationszeiten von mindestens fünf, noch besser von zehn Minuten bzw. große Beschleunigungen von beispielsweise 750•g zu wählen, um viele hämoglobinverarmte Erythrozyten mit dem niedrigeren spezifischen Gewicht im Bodensatz zu bekommen. Es erscheint hierzu sinnvoll, die Zentrifugationsbedingungen zu standardisieren. Bei der lichtmikroskopischen Untersuchung sollten möglichst viele Zellen (mindestens 50) ausgemessen werden, damit genaue Mittelwerte von Mittlerer Optischer Dichte und Kreisdurchmesser betrachtet und verglichen werden können.

Aus den vorliegenden Ergebnissen dieser Arbeit ergibt sich, daß die Morphologie von Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer und nichtglomerulärer Genese nach der Diaminobenzidin-Reaktion im Lichtmikroskop sehr gut beurteilt werden kann. Der verstärkte Kontrast läßt typische Merkmale dysmorpher Zellen wie Membranfaltung, Extrusionen und die verschiedenen Ringformen viel deutlicher erkennen als im ungefärbten Sedimentausstrich. Zusätzlich kann die Hämoglobinverarmung und die Verringerung der Kreisdurchmesser von Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer Genese nach computergestützter Messung dargestellt werden. Somit ist eine eindeutige Differenzierung von den eumorphen Zellen bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese möglich.

Ziel weiterer Studien sollte es sein, densitometrisch ermittelte Hämoglobinkonzentrationsverteilungsmuster von Erythrozyten aus dem Urin zu erstellen. Insbesondere Vergleiche von Gruppen mit Hämaturie glomerulärer und nichtglomerulärer Genese, aber auch innerhalb der Gruppe mit glomerulärer Hämaturie, könnten unter diesem Aspekt helfen, wichtige Erkenntnisse im Rahmen der Differenzierung nephrologischer und urologischer Erkrankungen zu gewinnen.

Ein Nachteil bei der Anfertigung der Dauerpräparate besteht gegenwärtig noch im erheblichen Zeitaufwand von drei Stunden, der für die Diaminobenzidin-Reaktion notwendig ist. Die mikroskopische Auswertung bedarf zusätzlich ca. 45 Minuten je Präparat. Ebenfalls der Aufwand an Materialien und Geräten ist sehr hoch, siehe Abschnitt 3.2. Der Urin sollte spätestens nach zwei bis vier Stunden verarbeitet sein (64, 72, 108). Es ist erkennbar, daß die computergestützte Auswertung von diaminobenzidingefärbten Erythrozyten zur Differenzierung einer Hämaturie glomerulärer bzw. nichtglomerulärer Genese aufgrund eines hohen Zeit- und Kostenaufwandes weder für die ambulanten nephrologischen und urologischen Praxen noch für das Krankenhaus geeignet ist. Es ist jedoch denkbar, daß durch verbesserte Färbemethoden bzw. durch schnellere mikroskopische, anwenderorientierte Rechnerprogramme, eine zeitsparende und genauere Auswertung eines Urinsedimentes zu erreichen ist. Mit Hilfe neuer Färbe- und Fixierungsmittel, welche weniger aggressiv sind und nicht ausgewaschen werden müssen, könnte eine Reduzierung der Anzahl der Spülungen bzw. der damit verbundenen Zentrifugationen erfolgen. In dieser Arbeit erfolgte die Markierung der Zellen durch kreisförmige Umrandung der Oberfläche mittels eines Zeichenprogramms. Denkbar wäre ein einfaches Anklicken der Erythrozyten mit anschließender computergestützter Oberflächenerkennung. Durch die Bestimmung des Hämoglobingehaltes und des Kreisdurchmessers sowie die Beurteilung der Morphologie der Zellen sind dann noch präzisere Differenzierungen in glomeruläre bzw. nichtglomeruläre Hämaturie möglich. Zusätzliche Vorteile einer computergestützten Auswertung wären, daß die Methode weniger subjektiv ist und insbesondere auch die Sedimente mit einem geringen Anteil dysmorpher Erythrozyten besser beurteilt werden können. HYODO beschreibt Untersuchungen über die Durchflußzytometrie, bei der eine vollautomatisierte quantitative Harnsedimentbeurteilung nach vorheriger Fluoreszenzmarkierung der Zellen im Urin erfolgt (66). Der Stellenwert dieser Methode zur Differenzierung einer Hämaturie muß durch weitere Studien ermittelt werden (123). Auch die von JANSSENS beschriebene Methode, bei der fluoreszenzmarkierte Antikörper gegen das Tamm-Horsfall-Protein an der Oberfläche dysmorpher Erythrozyten angelagert werden, hat sich aufgrund der aufwendigen Probenvorbereitung und Fluoreszenzmikroskopie im Rahmen der Hämaturiediagnostik nicht durchgesetzt (67).

Ein Einfluß der Konzentration von Serumkreatinin und Serumharnstoff auf den Hämoglobingehalt der Erythrozyten im Urin bei glomerulärer Genese konnte festgestellt werden. Es wurde nachgewiesen, daß bei Kreatininwerten größer/gleich 150 µmol/l im Serum der Hämoglobingehalt signifikant höher ist als bei Werten unter 150 µmol/l. Dieses Erkenntnis traf ebenfalls bei einem Harnstoffgehalt größer 8,4 mmol/l im Serum zu. Es muß betont werden, daß es sich bei der Auswertung nur um geringe Fallzahlen handelte, siehe Tabelle 13 auf Seite 59. Die Hämoglobinverarmung als typisches Merkmal dysmorpher Erythrozyten war bei erhöhten

Retentionen und somit bei fortgeschrittener Niereninsuffizienz nicht deutlich ausgeprägt. Ähnliche Ergebnisse wurden von KLINZING im Jahre 1994 aufgezeigt (81). In seinen Ausführungen wurde darauf hingewiesen, daß bei Serumkreatininwerten über 300 µmol/l und einer Serumharnstoffkonzentration über 24 mmol/l eine deutliche Reduktion der Ausscheidung dysmorpher Erythrozyten und Akanthozyten nachzuweisen war. Da es sich in der Studie ebenfalls nur um geringe Fallzahlen, acht Patienten mit Serumkreatinin >300 µmol/l und fünf Patienten mit Serumharnstoff >24 mmol/l handelte, konnten keine statistischen Aussagen formuliert werden. ROTH (108) beschreibt eine Abnahme des Anteils glomerulär-dysmorpher Formen im Sediment bei zunehmender Niereninsuffizienz, hoher entzündlicher Aktivität der Glomerulonephritis und forcierter Diurese. Auch von MÜLLER et al. (93) wurde eine Reduktion dysmorpher Zellen bei fortschreitender Niereninsuffizienz beobachtet und vermutet, daß durch die zunehmende Zerstörung des Nierengewebes die Fähigkeit der Umwandlung eumorpher Erythrozyten in dysmorphe Formen verlorengeht.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Diaminobenzidin-Reaktion an Erythrozyten zur Charakterisierung deren Morphologie, zur Einschätzung des Hämoglobingehaltes sowie zur Bestimmung des Kreisdurchmessers geprüft. Eine weitere Aufgabe war es festzustellen, inwieweit sich diese Merkmale bei dysmorphen Erythrozyten einer Hämaturie glomerulärer und eumorphen Zellen einer Hämaturie nichtglomerulärer Genese unterscheiden und ob bei einer nachgewiesenen Verringerung des Kreisdurchmessers bzw. des Hämoglobingehaltes Abhängigkeiten von dieser zu den Konzentrationen von Kreatinin und Harnstoff im Serum bestehen.

Nach Diaminobenzidin-Färbung ist eine sehr gute Beurteilung von Erythrozyten im Hellfeld-Mikroskop möglich. Eine Differenzierung in glomeruläre und nichtglomeruläre Formen kann einfach getroffen werden. Sie erscheint wesentlich leichter als eine Beurteilung ohne Färbemethoden im Hellfeld- bzw. Polarisationsmikroskop. Eumorphe Zellen sind homogen und kräftig gefärbt, die bikonkave Struktur ist vorhanden. Bei dysmorphen Zellen sind typische Merkmale wie Membranfaltungen, Extrusionen und Hämoglobinverarmung erkennbar. Aussagen zur Morphologie der einzelnen Erythrozyten können nach der Färbung genauer getroffen werden.

Da sich die Zellen gut kontrastiert darstellen, sind präzise Markierungen und anschließende Berechnungen des Kreisdurchmessers, aber auch der Mittleren Optischen Dichte als Maß für den Hämoglobingehalt der Erythrozyten möglich. Es wurde festgestellt, daß durch die Diaminobenzidin-Färbung eine Vergrößerung der Kreisdurchmesser der Zellen aufgetreten ist. Dies konnte sowohl bei Erythrozyten aus dem Venenblut mit bzw. ohne Urininkubation als auch bei denen aus den Gruppen mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese beobachtet werden. Die Vergrößerung der Zellen ist nicht so deutlich ausgeprägt, wenn diese vor der Diaminobenzidin-Reaktion im Urin inkubiert waren. Dies läßt auf eine Alteration der Erythrozyten durch den Urinkontakt schließen.

Bei der Betrachtung der berechneten Kreisdurchmesser in den Gruppen mit nichtglomerulärer Hämaturie fällt auf, daß die Erythrozyten, die auf der Grundlage einer Urolithiasis im Urin auftreten, kleiner sind als jene, welche bei benignen Tumoren nachgewiesen werden ($p = 0,017$). Signifikante Unterschiede der Kreisdurchmesser von dysmorphen und eumorphen Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer bzw. nichtglomerulärer Genese konnten nachgewiesen werden ($p < 0,05$). Die dysmorphen Zellen bei glomerulärer Hämaturie waren deutlich verkleinert.

In der Gruppe mit Hämaturie glomerulärer Genese waren die Erythrozyten aus den Urinproben mit mindestens 70 % dysmorpher Formen im Vergleich zu denen aus den Proben mit weniger als 70% dieser Zellen deutlich verkleinert ($p = 0,032$). Der Kreisdurchmesser der Erythrozyten aus dem Urin besitzt bei der Beurteilung der Genese einer Hämaturie eine wesentliche Bedeutung. Ein Anteil von größer/gleich 70 % dysmorpher Erythrozyten im Urinsediment deutet auf eine manifeste glomeruläre Erkrankung hin, Anteile von 20 % dysmorpher Zellen können jedoch bereits Hinweise auf eine beginnende glomeruläre und tubuläre Schädigung sein.

Neben den Betrachtungen der Größe der Zellen erfolgte die Berechnung ihres Hämoglobingehaltes. Quantitative Aussagen über die Hämoglobinverarmung von Erythrozyten stellen einen wichtigen diagnostischen Schritt zur Differenzierung nephrologischer und urologischer Krankheitsbilder dar. Die dysmorphen Zellen aus dem Urin von Patienten mit Glomerulonephritis sind im Vergleich zu

eumorphen aus dem Venenblut bzw. aus dem Urin von Untersuchungspersonen mit urologischen Erkrankungen an Hämoglobin verarmt ($p < 0,05$).

Nach der Färbung von Erythrozyten aus dem Urin mit Hilfe der Diaminobenzidin-Reaktion und der anschließenden Berechnung des Kreisdurchmessers und des Hämoglobingehaltes ist es möglich, die Gruppen mit eumorphen Zellen bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese und dysmorphen Zellen bei glomerulärer Hämaturie anhand eines der beiden Parameter signifikant zu differenzieren (jeweils $p < 0,05$).

Ebenfalls durch die gemeinsame Betrachtung von Kreisdurchmesser und Mittlerer Optischer Dichte der Erythrozyten aus dem Urin konnten mittels der Diskriminanzanalyse die dysmorphen eindeutig von den eumorphen Zellen unterschieden werden ($p < 0,05$). Mit Hilfe der Kreuzvalidierung ist es möglich, bei Betrachtung der Parameter Mittlere Optische Dichte und Kreisdurchmesser eine Zuordnung in die entsprechenden Untersuchungsgruppen zu vollziehen. Von den 100 Präparaten der Patienten mit Hämaturie nichtglomerulärer Genese konnten 95,9 % richtig eingeordnet werden. In der Gruppe mit glomerulärer Hämaturie wurden von den 50 Präparaten 45 richtig erkannt. Das entspricht 90 % dieser Fälle. Insgesamt konnten so 93,9 % korrekt in eine der beiden Gruppen klassifiziert werden. Durch Bestimmung der Mittleren Optischen Dichte und des Kreisdurchmessers von Erythrozyten besteht die Möglichkeit, eine sehr genaue Einteilung in dysmorphe und eumorphe Formen vorzunehmen.

Direkte Abhängigkeiten zwischen Hämoglobingehalt und Kreisdurchmesser der Erythrozyten bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese wurden nicht bewiesen. Diese Feststellung trifft ebenfalls auf die Gruppe mit glomerulärer Hämaturie zu. Obwohl in diesen Fällen beide Parameter deutlich verringert sind, läßt die Bestimmung eines der beiden Werte keine Rückschlüsse auf die Größe des anderen zu.

Ein alleiniger Urinkontakt der Erythrozyten bewirkt im Rahmen der Dysmorphogenese keinen Hämoglobinverlust. Zusätzliche Einflüsse müssen bereits intrarenal primäre Veränderungen an den Zellen bedingen. Es ist zu vermuten, daß die Entstehung dysmorpher Formen in einer Kombination von Schädigungsmechanismen zu sehen ist. Durch Kontakte der Erythrozytenmembran mit der Endothelzelle entstehen Membrangefügestörungen. Während der weiteren Passage durch das Tubulussystem kommt es durch die extrem veränderten osmotischen Bedingungen und die Einwirkung von Harnstoff zu Alterationen der Erythrozytenoberfläche. Folgen sind dann sowohl eine Abnahme des Hämoglobingehaltes, aber auch eine Verringerung des Kreisdurchmessers.

Erythrozytenschatten konnten nach der Diaminobenzidin-Reaktion im Lichtmikroskop schwach angefärbt nachgewiesen werden. Die Ursache für den geringen Kontrast liegt im niedrigen Hämoglobingehalt dieser Zellderivate. Es ist davon auszugehen, daß viele dieser Formen für den Untersucher im Hellfeld-Mikroskop auch nach der Färbung nicht erkennbar sind.

Bei der Herstellung der Präparate für die Elektronenmikroskopie wurde das Zellmaterial aus dem Überstand nach der Zentrifugation gewonnen. Durch die spezielle Herstellungsmethode gelangten hauptsächlich Zellen mit niedrigem spezifischen Gewicht, also Schatten, zur Auswertung. In diesen Präparaten konnten bei den Erythrozytenfragmenten ebenfalls die typischen Merkmale von dysmorphen Zellen wie Membranfaltung und Extrusionen festgestellt werden. Auffällig war jedoch ein besonders schmaler Randsaum, was auf die stärkere Schädigung der Zellen hindeutet. Sowohl bei der elektronen- als auch lichtmikroskopischen Auswertung ist ein breiter kontrastreicher Zellabschnitt im Bereich der Vesikel nachweisbar gewesen, der homogen gefärbt ist und auf eine Ansammlung von Hämoglobin hindeutet.

Die Diaminobenzidin-Reaktion an Erythrozyten aus dem Urin mit anschließender computergestützter Auswertung ist eine geeignete Methode, dysmorphe Zellen bei glomerulärer Hämaturie von eumorphen Zellen bei Hämaturie nichtglomerulärer Genese zu differenzieren. Durch die Färbung ist eine einfachere morphologische Beurteilung der Erythrozyten als im Phasenkontrastmikroskop gewährleistet. Die computergestützte Auswertung ist objektiv. Auf Grund des hohen Material-, Zeit- und somit Kostenaufwandes besitzt die Möglichkeit der mikroskopischen Beurteilung von Erythrozyten nach Diaminobenzidin-Färbung gegenwärtig Studiencharakter. Als nichtinvasives Verfahren zur Eingrenzung einer glomerulären bzw. nichtglomerulären Hämaturie in der klinischen Praxis bleibt die Analyse der Harnerythrozyten mit Hilfe des Phasenkontrastmikroskops die Methode der Wahl.

7. Anhang

Tabelle 15 a: Meßwerte und Berechnungen der Vergleichsgruppe 1

Vergl.Gr.1				
Präp.Nr.	mittlerer Grauwert	Transmission	Mittlere optische Dichte	Kreisdurchmesser
1	73,16	0,2869	0,5423	7,485
2	64,45	0,2527	0,5973	8,035
3	84,05	0,3296	0,482	8,35
4	90,51	0,3549	0,4498	8,285
5	75,89	0,2976	0,5264	8,32
6	100,11	0,3926	0,4061	7,82
7	97,16	0,381	0,4191	7,94
8	92,87	0,3642	0,4387	8,15
9	117,45	0,4601	0,3367	7,6
10	80,4	0,3153	0,5013	7,78
11	109,79	0,4305	0,366	7,885
12	74,99	0,2941	0,5315	8,435
13	78,59	0,3082	0,5112	8,66
14	83,29	0,3266	0,4856	8,21
15	84,43	0,3311	0,48	7,93
16	99,69	0,3909	0,4079	8,39
17	73,88	0,2897	0,538	7,64
18	72,29	0,2835	0,5475	7,85
19	89,7	0,3518	0,4537	7,77
20	101,165	0,3967	0,4015	7,42
21	75,145	0,2947	0,5306	8,01
22	75,34	0,2955	0,5295	7,58
23	77,81	0,3051	0,5155	7,91
24	76,61	0,3004	0,5223	7,46
25	88,33	0,3467	0,4604	7,93
26	75,68	0,2968	0,5276	8,14
27	83,31	0,3267	0,4858	8,01
28	88,315	0,3463	0,4605	7,945
29	71,59	0,2807	0,5517	8,21
30	74,74	0,2931	0,533	8,12
31	76,99	0,3019	0,5201	8
32	64,75	0,2539	0,5953	8,31
33	77,53	0,304	0,5171	8,23
34	71,05	0,2786	0,555	7,91
35	72,2	0,2831	0,548	7,94
36	77,525	0,304	0,5171	8,21
37	87,015	0,3412	0,4669	7,52
38	70,22	0,2754	0,5601	8,1
39	73,68	0,2889	0,5392	7,985
40	75,55	0,2963	0,5283	8,3
41	76,1	0,2984	0,5252	8,39
42	78,68	0,3085	0,5107	8,03
43	73,48	0,2882	0,5404	8,18
44	76,345	0,2994	0,4238	8,04
45	72,32	0,2836	0,5473	8,09
46	66,3	0,26	0,585	8,3
47	72,42	0,284	0,5467	8,23
48	73,13	0,2868	0,5424	8,25
49	73,52	0,2883	0,5401	7,46
50	80,34	0,3151	0,5016	7,65

Tabelle 15 b: Meßwerte und Berechnungen der Vergleichsgruppe 2

Vergl.Gr.2				
Präp.Nr.	mittlerer Grauwert	Transmission	Mittlere optische Dichte	Kreisdurchmesser
1	85,72	0,3362	0,4735	7,73
2	69,58	0,2729	0,5641	7,92
3	78,88	0,3093	0,5096	8,13
4	80,09	0,3141	0,503	7,98
5	69,44	0,2723	0,5649	8,375
6	87,02	0,3413	0,4669	7,61
7	82,91	0,3251	0,4879	7,875
8	80,02	0,3138	0,5033	6,41
9	96,86	0,3798	0,4204	7,51
10	92,37	0,3622	0,441	7,1
11	96,28	0,3776	0,423	6,67
12	102,82	0,4032	0,3945	7,635
13	85,04	0,3335	0,4769	8,66
14	77,47	0,3034	0,5174	8,21
15	78,58	0,3087	0,5112	8,16
16	102,49	0,4019	0,3959	7,67
17	86,91	0,3408	0,4675	7,395
18	75,78	0,2972	0,527	7,99
19	75,17	0,2948	0,5305	7,86
20	101,33	0,3974	0,4008	7,5
21	85,27	0,3344	0,4757	7,73
22	74,81	0,2934	0,5326	7,43
23	85,95	0,3371	0,4723	8,02
24	87,5	0,3431	0,4655	6,76
25	86,94	0,3409	0,4673	6,9
26	74,45	0,292	0,5347	8,235
27	73,09	0,2866	0,5427	7,67
28	92,64	0,3633	0,4397	8,11
29	80,67	0,3164	0,4998	7,55
30	66,93	0,2625	0,5809	8,25
31	75	0,2941	0,5315	8,38
32	70,01	0,2745	0,5614	8,44
33	75,47	0,296	0,5288	7,885
34	83,085	0,3258	0,487	7,77
35	76,56	0,3002	0,5225	7,455
36	75,22	0,295	0,5302	7,65
37	81,11	0,3181	0,4975	7,8
38	78,64	0,3084	0,5109	6,39
39	71,1	0,2788	0,5547	7,62
40	77,09	0,3023	0,5195	8,3
41	70,68	0,2772	0,5572	7,94
42	74,64	0,2927	0,5336	7,4
43	74,19	0,2909	0,5362	7,58
44	87,36	0,3426	0,4652	7,795
45	81,22	0,3185	0,4969	7,8
46	85,56	0,3355	0,4743	7,51
47	71,19	0,2792	0,5541	7,86
48	83,86	0,3289	0,483	8,215
49	69,69	0,2733	0,5634	7,94
50	81,16	0,3183	0,4972	7,49

Tabelle 15 c: Meßwerte und Berechnungen der Gruppe Urolithiasis

Urolithiasis				
Präp.Nr.	Mittlerer Grauwert	Transmission	Mittlere optische Dichte	Kreisdurchmesser
1	61,86	0,2426	0,6151	5,8
2	60,19	0,236	0,627	6,31
3	66,4	0,2604	0,5844	5,81
4	70,3	0,2757	0,5596	6,16
5	78,65	0,3084	0,5108	5,83
6	63,58	0,2493	0,6032	6,49
7	75,41	0,2957	0,5291	7,01
8	67,74	0,2656	0,5757	6,95
9	75,06	0,2944	0,5311	6,95
10	58,77	0,2305	0,6374	6,55
11	78,52	0,3079	0,5116	7,56
12	72,32	0,2836	0,5473	6,895
13	72,31	0,2836	0,5473	7,28
14	73,61	0,2887	0,5396	7,94
15	78,65	0,3084	0,5108	7,63
16	77,24	0,3029	0,5187	7,06
17	78,52	0,3079	0,5116	7,56
18	79,35	0,3112	0,507	6,89
19	66,57	0,2611	0,5833	7,49
20	66,14	0,2594	0,5861	6,87
21	87,02	0,3413	0,4669	7,815
22	70,04	0,2747	0,5612	7,74
23	99,6	0,3906	0,4083	6,71
24	131,68	0,5164	0,287	5,85
25	96,92	0,3801	0,4201	7,57
26	88,73	0,348	0,4585	5,955
27	61,55	0,2414	0,6173	7,5
28	89,06	0,3493	0,4569	7,11
29	75,48	0,296	0,5287	6,72
30	80,44	0,3155	0,5011	8,03
31	74,81	0,2934	0,5326	7,63
32	81,75	0,3206	0,4941	7,5
33	69,14	0,2711	0,5668	7,38
34	84,55	0,3316	0,4794	8,01
35	67,205	0,2635	0,5791	7,59
36	68,39	0,2682	0,5715	7,72
37	87,49	0,3431	0,4646	7,81
38	71	0,2787	0,5553	7,64
39	82,47	0,3234	0,4902	7,38
40	84,12	0,3299	0,4816	7,875
41	88,62	0,3475	0,549	7,465
42	79,96	0,3136	0,5037	7,54
43	82,15	0,3222	0,4919	8,18
44	85,04	0,3335	0,4769	7,545
45	80,17	0,3144	0,5025	8,025
46	85,57	0,3356	0,4742	8,28
47	79,435	0,3115	0,5065	7,89
48	76,85	0,301	0,5214	7,18

Tabelle 15 d: Meßwerte und Berechnungen der Gruppe mit malignen Tumoren

maligne Tumoren				
Präp. Nr.	Mittlerer Grauwert	Transmission	Mittlere optische Dichte	Kreisdurchmesser
1	63,11	0,2475	0,6064	7,65
2	55,34	0,217	0,6635	7,49
3	56,05	0,2198	0,658	7,65
4	88,31	0,3463	0,4605	7,21
5	68,54	0,2688	0,5706	6,94
6	77,08	0,3023	0,5196	6,76
7	74,94	0,2939	0,5318	7,16
8	58,48	0,2293	0,6395	6,38
9	83,8	0,3286	0,4833	8,28
10	97,1	0,3808	0,4193	7,61
11	81,02	0,3177	0,4979	7,93
12	74,28	0,2913	0,5357	6,815
13	104,61	0,4102	0,387	6,93
14	85,18	0,334	0,4762	6,94
15	77,85	0,3053	0,5153	7,03
16	92,35	0,3622	0,4411	6,24
17	86,96	0,341	0,4672	6,945
18	67,6	0,2651	0,5766	7,52
19	81,75	0,3206	0,4941	7,21
20	77,98	0,3058	0,5146	6,925
21	70,22	0,2754	0,5601	7,28
22	68,7	0,2694	0,5696	7,96
23	70,93	0,2782	0,5557	8,12
24	112,17	0,4399	0,3567	7,26
25	99,88	0,3917	0,4071	7,38
26	76,76	0,301	0,5214	7,49
27	61,96	0,243	0,6144	7,74
28	65,46	0,2567	0,5906	7,83
29	95,07	0,3728	0,4285	7,575
30	100,97	0,396	0,4023	7,95
31	90,2	0,3537	0,4513	7,97
32	90,55	0,3551	0,4497	7,78
33	91,34	0,3582	0,4459	8,01
34	74,26	0,2912	0,5358	8,12
35	80,03	0,3138	0,5033	8,54
36	94,96	0,3724	0,429	8,02
37	68,45	0,2684	0,5712	8,185
38	67,5	0,2647	0,5772	7,945
39	64,48	0,2529	0,5971	7,5

Tabelle 15 e: Meßwerte und Berechnungen der Gruppe mit benignen Tumoren
benigne Tumoren

Präp.Nr.	Mittlerer Grauwert	Transmission	Mittlere optische Dichte	Kreisdurchmesser
1	113,1	0,4435	0,3531	6,89
2	79,32	0,3111	0,5072	7,69
3	73,79	0,2894	0,5385	8,15
4	70,24	0,2755	0,56	7,16
5	78,78	0,3089	0,5101	8,265
6	80,61	0,3161	0,5002	6,78
7	55,41	0,2173	0,663	7,61
8	85,51	0,3353	0,4745	8,11
9	85,34	0,3347	0,4754	8,28
10	76,39	0,2996	0,5235	7,99
11	74,62	0,2926	0,5337	8,06

Tabelle 15 f: Meßwerte und Berechnungen der Gruppe mit Glomerulonephritis

intern.Fälle				
Präp. Nr.	Mittlerer Grauwert	Transmission	Mittlere optische Dichte	Kreisdurchmesser
1	119,6	0,469	0,3288	5,86
2	110,17	0,432	0,3645	6,04
3	145,15	0,5692	0,2447	5,65
4	141,64	0,5555	0,2554	6,27
5	152,12	0,5965	0,2244	5,47
6	125,31	0,4914	0,3086	6,1
7	130,34	0,5111	0,2915	5,53
8	125,69	0,4929	0,3072	5,86
9	125,84	0,4935	0,3067	5,86
10	91,33	0,3582	0,4459	5,77
11	120,84	0,4739	0,3243	5,11
12	98,31	0,3855	0,4139	8,26
13	80,12	0,3142	0,5028	6,93
14	134,98	0,5293	0,2763	6,91
15	140,77	0,552	0,258	6,46
16	190,36	0,4765	0,127	5,8
17	178,23	0,6989	0,1556	5,82
18	187,43	0,735	0,1337	5,45
19	188,93	0,7409	0,1302	6,42
20	110,37	0,4328	0,3637	8,01
21	104,73	0,4107	0,3865	8,46
22	149,82	0,5875	0,231	6,8
23	164,34	0,6445	0,1908	6,29
24	134,98	0,5293	0,2763	8,14
25	196,81	0,7718	0,1125	6,37
26	199,82	0,7836	0,1059	5,42
27	157,19	0,6164	0,2101	6,93
28	133,89	0,5251	0,5798	5,87
29	150,16	0,5889	0,23	6,25
30	136,1	0,5337	0,2727	5,9
31	122,11	0,4789	0,3198	6,84
32	163,32	0,6405	0,1935	6,18
33	138,16	0,5418	0,2662	6,12
34	119,49	0,4686	0,3292	6,94
35	162,74	0,6382	0,195	5,44
36	152,98	0,5999	0,2219	5,88
37	146,85	0,5759	0,2397	6,56
38	128,54	0,5041	0,2975	6,38
39	109,24	0,4284	0,3682	6,32
40	147,98	0,5803	0,2363	5,96
41	110,31	0,4326	0,3639	6,32
42	128,93	0,5056	0,2962	6,94
43	136,35	0,5347	0,2719	6,56
44	120,51	0,4726	0,3255	6,55
45	118,18	0,4635	0,334	5,99
46	125,34	0,4915	0,3085	7,02
47	122,46	0,4802	0,3185	6,79
48	160,56	0,6296	0,2009	6,68
49	120,32	0,4718	0,3262	5,8
50	166,51	0,653	0,1851	6,75

8. LITERATURVERZEICHNIS

1. ADDIS. T.: Glomerular Nephritis. MacMillian, New York 1948, p. 42
2. ALTWEIN, J. E., JACOBI, G. H.: Urologie. 2. Auflage, Ferdinand Enke Verlag Stuttgart (1986)
3. ARM, JP et al.: Hematuria. British Journal of Urology, 58:211, (1986)
4. BARTL, K.: Anwendung der Pseudoperoxidase-Eigenschaft des Hämoglobins auf normale Erythrozyten sowie auf dysmorphe Erythrozyten aus dem Harn von Patienten mit Glomerulonephritis. Dissertation vom 15.05.1995
5. BÄUMLER, H., HALBHUBER, K.-J., STIBENZ, D., LERCHE, D.: Topo-optical investigations of human erythrocyte glycocalix conformational changes induced by dextran. Biochim. Biophys. Acta. 923 (1987), 22-28
6. BESSIS, M.: Living blood cells and their ultrastructure. New York, Springer Verlag (1973)
7. BIRCH, D. F., FAIRLEY, K. F.: Hematuria: glomerular or non-glomerular?. Lancet II (1979), 845-846
8. BIRCH, D. F., FAIRLEY, K. F., WHITWORK, J. A., FORBES, I. K., FAIRLEY, J. K., CHESHIRE, G. R., RYAN, G. B.: Urinary erythrocyte morphology in the diagnosis of glomerular hematuria. Clin. Nephrol. 20 (1983), 78-84
9. BOEGE, F., LUTHER, A.: Gesamtproteinbestimmung im Urin: Adaptierung einer nephelometrischen Methode zur Erfassung tyoischer Leitproteine und Bence-Jones-Proteine. Lab. med. 13 (1989), 14-19
10. BOESKEN, W. H.: Die SDS-PAA-Elektrophorese der Urinproteine: Eine Methode zur Differentialdiagnose der Nephropatien und zur Analyse extrarenaler Proteinurien. Urologe B 17 (1977), 140-144
11. BOESKEN, W. H., MAMIER, A.: Molekulargewichtsbezogene Urinprotein-Elektrophorese in der Diagnostik von Nierenkrankheiten. Lab. med. 9 (1985), 285-291

12. BOHLE, A., v. GISE, H., MIKELER, E., RASSWEILER, J.: Morphologic Contribution on Gross Hematuria in Mild Mesangioproliferative Glomerulonephritis Without Crescents. *Klin. Wochenschr.* 63 (1985), 371-378
13. BOHLE, A. et al.. The different forms of glomerulonephritis, morphological and clinical aspects, analysed in 2500 patients. *Klin. Wochenschr.* 54 (1976), 59-73
14. BOHLE, A., v. GIESE, H., MIKELER, E.: Zue Pathogenese der Makrohämaturie bei IgA-Nephritis. *Pathologe* 5 (1984), 322-325
15. BORDER, W. A., WARD, H. I., KAMIL, E. S., COHEN, A. H.: Induction of membranous nephropathy in rabbits by administration of an exogenous cationic antigen: Demonstration of a pathogenetic role for electrical charge. *J. Clin. Invest.* 69 (1982), 451-461
16. BRASS, H., PHILIPP, T., SCHULZ, W.: *Manuale nephrologicum*. Dustri-Verlag Dr. Karl Feistle (1994)
17. BROSIUS, G.: *SPSS/PC+ Advanced Statistics und Tables*. McGraw-Hill Book Company GmbH Hamburg; New York u.a. (1989)
18. BUTOWSKI, R. J., WIESLANDER, J., WISDOM, B. J., BARR, J. F., NOELKEN, M. E., HUDSON, B. G.: Properties of the globular domain of type IV collagen and ist relationship to the Goodpasture antigen. *J. Biol. Chem.* 260 (1985), 3739-3747
19. CHANG, B. S.: Red cell morphology as a diagnostic aid in hematuria. *J.A.M.A.* 252 (1984), 1747-1749
20. CLASTER, S., WHITE, E., WOOLWORTH, V., QUINTANILHA, A.: Degradation of erythrocyte glycophorin results in increased membrane bound hemoglobin. *Arch. Biochem. Biophys.* 285 (1991), 147-152
21. CONZELMANN, M., CONEN, D., BESCH, W., DUBACH, U. C., THIEL, G.: Der Nachweis glomerulärer Erythrozyten im Urin mit Phasenkontrastmikroskopie: praktikabel in der ambulanten Praxis?. *Schweiz. Med. Wochenschr.* (1988), 541-546
22. COUSER, G.: Mechanisms in glomerular injury in immuncomplex diseases. *Kidney Intern.* 28 (1985), 569-583
23. DAVID, H.(Hrsg.): *Wörterbuch der Medizin*. Verlag Volk und Gesundheit Berlin (1984)

24. DE SANTO, N. G., NUZZI, F., CAPODICASA, G., LAMA, G., CAPUTO, G., ROSATI, P., GIORDANO, C.: Phase Contrast Microscopy of the Urine Sediment for the Diagnosis of Glomerular and Nonglomerular Bleeding – Data in Children and Adults with Normal Creatinine Clearance. *Nephron* 45 (1987), 35-39
25. DE METZ, M., SCHIPHORST, P. P., GO, R. I.: The analysis of erythrocyte morphologic characteristics in urine using a hematologic flow cytometer and microscopic methods. *Am. J. Clin. Pathol.* 95 (1991), 257-261
26. DUTZ, H., MEBEL, M., GROßMANN, P., GUDDAT, H.-M., STRANGFELD, D.: *Urologie und Nephrologie, Ein Leitfaden für Studenten. Volk und Gesundheit Berlin, 2. überarbeitete und erweiterte Auflage* (1983)
27. FAIRLEY, K. F., BIRCH, D. F.: Hematuria: A simple method of identifying glomerular bleeding. *Kidney Intern.* 21 (1982), 105-108
28. FASSETT, R. G., HORGAN, B. A., MATHEW, T. H.: Detection of glomerular bleeding by phase-contrast microscopy. *Lancet* I (1982), 1432-1434
29. FASSETT, R. G., HORGAN, B. A., GOVE, D., MATHEW, T. H.: Scanning electron microscopy of glomerular and nonglomerular red blood cells. *Clin. Nephrol.* 20 (1983), 11-16
30. FASSETT, R. G., OWEN, J. E., FAIRLEY, J., BIRCH, D. F., FAIRLEY, K. F.: Urinary red-cell morphology during exercise. *Brit. Med. Journal* 285 (1982), 1455-1457
31. FRIEDREICH, N.: Ein Beitrag zur Lebensgeschichte der roten Blutkörperchen. *Virchows Archiv* 41 (1887), 395-411
32. FRUNDER, H.: *Physiologische Chemie. Volk und Welt, Berlin* (1985)
33. FÜNFSTÜCK, R.: Differenzierte Hämaturiediagnostik. *Der Kassenarzt* Nr. 12 (1999), 43-49
34. FÜNFSTÜCK, R.: Differenzierte Hämaturiediagnostik. 104. Kongreß der Dt. Gesellschaft für Innere Medizin, Vortragskolloquium Nephrologie, 18.04.1998 Wiesbaden
35. FÜNFSTÜCK, R., HALBHUBER, K.-J., KÜHN, B., KÜHN, R., OEHRING, H., SCHEVEN, Ch., LINSS, W., STEIN, G.: Dysmorphic Erythrocytes in Glomerulonephritis, 1. Electron Microscopical and Histochemical Investigation. *Cell. mol. Biol.* 40 (8) (1994), 1113-1124

36. FÜNFSTÜCK, R., KLINZING, S., STEIN, G., SCHULZ, W., RISLER, T., RÖSCH, R., DÖLL, H.-P.: Dismorphe Erythrozyten im Urin bei unterschiedlichen Glomerulonephritisformen. Nieren- und Hochdruckkrankheiten, Jahrgang 24, Nr. 10 (1995), 554-558
37. FÜNFSTÜCK, R., SCHUSTER, F. X., STEIN, G., BEINTKER, M., SCHRAMEK, P., JANSKA, U.: Zur Bedeutung der Erythrozytenmorphologie bei glomerulären und nicht-glomerulären Hämaturien. Urol. Nephrol. 82 (1989), 85-91
38. FÜNFSTÜCK, R., STEIN, G., HALBHUBER, K.-J.: Pathogenesis of dysmorphic erythrocytes in glomerulonephritis. First International Journeys of Isolated Asymptomatic, Microhematuria, Buenos Aires 22.-23.08.1996
39. FURTHMEYER, H., GALARDY, R. E., TOMITA, M., MARCHESI, V. T.: The intramembranous Segment of Human Erythrocyte Glycophorin A. Arch. Biochim. Biophys. 185 (1978), 21-29
40. GEBRAN, S. J., ROMANO, E. L., PONS, H. A., CARIANI, L., SOYANO, A. N.: A modified colormetric method for the measurement of phagocytosis and antibody-dependent cell cytotoxicity using 2,7-diaminofluorene. J. Immunol. Methods (1992), 255-260
41. GEYER, G.: Ultrahistochemie. 2. Überarbeitete Auflage. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1973)
42. GEYER, G.: Environmental alterations of the erythrocyte glycocalyx. Postepy Biol. Kom. 4 (1978), 341-354
43. GEYER, G.: How sensitive may cytochemical methods detect alterations of the glycocalyx? Bas. Appl. Histochem. 24 (1980), 3-15
44. GIMBEL, A., BRUNNER, E., BREITGIESER, P., QUELLHORST, E.: Bestimmung von Erythrozytendurchmessern im Urin bei urologischen Erkrankungen und der sogenannten asymptomatischen Mikrohämaturie. Klin. Wochenschr. 66 (1988), 545-551
45. GRABENSEE, B., FRANZ, H. E., RISLER, T., SCHOLLMAYER, P., STEIN, G.: Therapie der primären Glomerulonephritis. Dt. Ärzteblatt 89 (1992), C-2180-2187
46. GRAHAM, R. C., KARNOVSKY, M. J.: The early stages of absorption of injected horseradish peroxidase in the proximal tubules of the mouse kidney. Ultrastructural cytochemistry by a new technique. J. Histochem. Cytochem. (1966), 291-302

47. GUDER, W. G., HOFMANN, W.: Urinproteindiagnostik. Produktinformation Behringwerke (1991), 110-139
48. HALBHUBER, K.-J., GLIESING, M., STIBENZ, D., MAKOVITZKY, J.: Topo-optical investigations of the human erythrocyte glycocalyx related changes. *Histochem.* 81 (1984), 187-193
49. HALBHUBER, K.-J., FRÖBER, R., FEUERSTEIN, H., SCHEVEN, Ch., UNGER, J., STIBENZ, D., RUMPEL, E., LINSS, W., GEYER, G.: Die Bedeutung der Membran für die Sequestration gealterter Erythrocyten. *Gegenbaurs morph. Jahrb., Leipzig* 127 (1981), 605-609
50. HALBHUBER, K.-J., FÜNFSTÜCK, R., KÜHN, B., KÜHN, R., BAUMANN, E., KLINGER, M., OEHRING, H., STEIN, G.: Dysmorphic Red Cell Formation in Glomerulonephritis, 2. In Vitro Generation of dysmorphic Erythrocytes, *Cell. mol. Biol.* 40 (8) (1994), 1125-1133
51. HALBHUBER, K.-J., LEMKE, C., STIBENZ, D., LINSS, W.: Activation of acetylcholine esterase (ACHE) as a sign for erythrocyte membrane alteration. *Exp. Path.* 25 (1984), 35-44
52. HALBHUBER, K.-J., LINSS, W., SCHEVEN, Ch., STIBENZ, D.: The erythrocyte membran structure - alterations by banking and aging. *Exp. Path. Suppl.* 12 (1986)
53. HALBHUBER, K.-J., LINSS, W., ZIMMERMANN, N., GEHRING, H., PÄTZOLD, L.: Cytochemical and cellbiological investigations of the signal function of the erythrocyte plasmalemma – the membrane structure as code for cell life span. *Acta. Histochem., Suppl.* Bd. XXXIII (1986), 23-44
54. HALBHUBER, K.-J., MEYER, H. W., STIBENZ, D., RUMPEL, E., SCHEVEN, Ch., LINSS, W.: Vergleichende Untersuchungen an Vesikeln von Erythrozyten. *Verh. Anat. Ges.* 76 (1982), 153-154
55. HALBHUBER, K.-J., NEHLER, G., OEHRING, H., ZIMMERMANN, N.: Investigation on secondary elimination of erythrocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 43 (1984), 25-26
56. HALBHUBER, K.-J., STIBENZ, D., BÄUMLER, H.: Topo-optical investigations of the conformational change of the erythrocyte glycocalyx in dependence on extracellular pH and presence of dextran. *Acta histochem., Suppl. Band XXXIII* (1986), 55-60
57. HALBHUBER, K.-J., MEYER, H. W., FRÖBER, R., RUMPEL, E., and GEYER, G.: Defined rearrangement of the membrane of banked erythrocytes. *Acta. Biol. Med. germ.* (1981)

58. HALBHUBER, K.-J., STIBENZ, D., MÜLLER, U. A., FRÖBER, R., FEUERSTEIN, H., MEYER, H. W., AUGSTEN, K., LINSS, W.: Die alterierte Erythrozytenmembran, 1. Ultra-histochemische und zellbiologische Untersuchungen zur Aktivierung der Acetylcholinesteras (ACHE) und Demaskierung von IgG-Rezeptoren. *Acta. histochem.* 70 (1982), 290-325
59. HALBHUBER, K.-J., STIBENZ, D., MEYER, H. W., FRÖBER, R., LINSS, W.: Lokale Remodellierungsprozesse am Plasmalemm von Erythrozyten. *Verb. Anat. Ges.* 76 (1982), 55-56
60. HALBHUBER, K.-J., ZIMMERMANN, N., OEHRING, H., STIBENZ, D., LINSS, W.: Red blood cell aging-membrane skeleton alteration and IgG receptor expression. *Folia Histochem.Cytobiol.* 25 (2) (1987), 137-142
61. HANKER, J. S., YATES, P. E., METZ, C. B., RUSTIONI, A.: A new specific, sensitive and non-carcinogenic reagent for the demonstration of horseradish peroxidase. *J. Histochem.* (1977), 789-792
62. HAUTMANN, R.: Urolithiasis: Epidemiologie und Pathogenese. *Dtsch. Ärztebl.* 82 (1985), 27
63. HILDEBRANDT, F., HECHT, A., KÖNIG, B., BRANDIS, M.: Exakte Beschreibung nichtglomerulärer und glomerulärer Erythrozytenformen bei kindlicher Hämaturie. *Monatsschr. Kinderheilkd.* 136 (1988), 10-16
64. HOFMANN, W., GUDER, W. G.: Labordiagnostische Verfahren zur Differenzierung einer Hämaturie. *Der Bay. Int.* 18 (1998), 89-96
65. HOFMANN, W., GUDER, W. G., EDEL, H. H.: A new strategy for characterizing proteinuria and haematuria from a single pattern of defined proteins in urine. *Eur. J. Clin.Chem. Clin. Biochem.* 9 (1992), 707-712
66. HYODO, T., KUMANO, K., HAGA, M., SAKAI, T.: Detection of glomerular and non-glomerular red blood cells by automated urinary sediment analyzer. *Jpn. J. Nephrol.* 37 (1995), 35-43
67. JANSSENS, M. W.: New markers for analyzing the cause of hematuria. *Kidney Int.* 46, Suppl. 47 (1994), 115-116
68. JOCHAM, D., MILLER, K.: Praxis der Urologie, Band I. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, (1994)

69. KAIHO, S., MIZUNO, K.: Sensitive assay systems for detection of hemoglobin with 2,7-diaminofluorene: histochemistry and colorimetry for erythrodifferentiation. *Anal. Biochem.* (1985), 117-120
70. KAY, M. M. B., GOODMAN, J. R.: IgG antibodies do not bind to band 3 in intact erythrocytes; enzymatic treatment of cells is required for IgG-binding. *Biomed. Biochim. Acta* 43 (1984), 841-846
71. KAYSEN, G. A., MYERS, B. D., COUSER, W. G., RABKIN, R., FELTS, J. M.: Mechanisms and consequences of proteinuria. *Lab. Invest.* 54 (1986), 479-498
72. KEIL, E., FIEDLER, H.: *Klinische Chemie systematisch*. Uni-Med Verl. Bremen (2000)
73. KERJASCHKI, D., FARQUHAR, M. G.: Immunocytochemical localization of the Heyman-Nephritis antigen in glomerular epithelial cells of normal Lewis rats. *J. Exp. Med.* 157 (1983), 667-685
74. KINCAID-SMITH, P.: Hematuria and exercise-related hematuria. *Brit. Med. J.* 285 (1982), 1595-1597,
75. KINDRACHUK, RW et al.: In: Walsh PC et al. (eds) *Campbell's urology*. Saunders, Philadelphia, p. 285 (1980),
76. KITAMOTO, Y., TOMITA, M., AKAMINE, M., INOUE, T., ITOH, J., TAKAMORI, H., SATO, T.: Differentiation of Hematuria Using a Uniquely Shaped Red Cell. *Nephron* 64 (1993), 32-36
77. KITAMOTO, Y., YIDE, C., TOMITA, M., SATO, T.: The mechanism of glomerular dysmorphic red cell formation in the kidney. *Tohoku J. Exp. Med.* 167 (1992), 93-105
78. KLEPPEL, M. M., MICHAEL, A. F., FISH, A. J.: Antibody specificity of human glomerular basement membrane type IV collagen NC1 subunits. *J. Biol. Chem.* 261 (1986), 16547-16552
79. KLEPPEL, M. M., SANTI, P. A., CAMERON, J. D., WIESLANDER, J., MICHAEL, A. F.: Human tissue distribution of novel basement membrane collagen. *Am. J. Pathol.* 134 (1989), 813-825
80. KLINGER, M., HALBHUBER, K.-J.: IgG receptor expression during in vitro ageing of erythrocytes. *Biomed. Biochim. Acta* 43 (1984), 88-90

81. KLINZING, S.: Zur Häufigkeit dysmorpher Erythrozyten im Urin bei chronischen Glomerulonephritiden. Dissertation vom 25.04.1994
82. KOCH, K. M., SCHUSTER, H.-P.: Der Internist. Nephrologie. Jahrgang 36, Heft 3, März 1995. Springer Verlag Berlin Heidelberg (1995)
83. KUBOTA, H., YAMABE, H., OZAWA, K., FUKUSHI, K., CHIBA, N., SEINO, S., MIYATA, M., INUMA, H., ONODERA, K.: Mechanism of Urinary Erythrocyte Deformity in Patients with Glomerular Disease. Nephron 48 (1988), 338-339
84. KUHLMANN, U., WALB, D., LUFT, F. C.: Nephrologie, Pathophysiologie – Klinik Praxis. 3. Aufl., Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1998)
85. LEICA, Das Mikroskop, Leitz DMR, Anleitung, Leica Mikroskopie und Systeme GmbH Wetzlar, Ausgabe von 1992
86. LIN, J.-T. et al.: Mechanism of Hematuria in Glomerular Disease. Nephron 35 (1983), 68-72
87. LUTZ, H. V., LIU, S.-C. and PALEK, J.: Release of spectrin-free vesicles from human erythrocytes during ATP-depletion. I. Characterizations of spectrin free vesicles. J. Cell. Biol. 73 (1977), 548-560
88. MAKOVITZKY, J.: Polarization Optical Analysis of Blood Cell Membranes. Progr. Histochem. Cytochem., Vol. 15, No.3 (1984), 100 S.
89. MARCHESI, V. T.: Functional proteins of the human red blood cell membrans. Semin. Hematol. 16 (1979), 3-20
90. MARCHESI, V. T.: The red cell membrane skeleton: Recent progress. Blood 61(1) (1983), 1-11
91. MOURADIAN, J. A., SHERMAN, R. L.: Passage of an erythrocyte through a glomerular basement membrane gap. New. Engl. J. Med. 293 (1975), 940-941
92. MÜLLER, H., SCHMIDT, U., LUTZ, H. U.: On the mechanism of red blood cell shape change and release of spectrin-free vesicles. Ixth International Symposium on Strucure and Function of Erythroid Cells, Berlin August 27th – 30th (1980), p. 37

93. MÜLLER, V., SIEGEL, O., SIEGEL, S., FLÜGEL, W., GÖBEL, U., NATUSCH, R., PILZ, S: Die Differenzierung der Hämaturie durch phasenkontrastmikroskopische Untersuchungen von Harnerythrozyten. Z. Urol. Nephrol. 82 (1989), 277-283
94. NATUSCH, R., DITSCHERLEIN, G.: Nierenbiopsie. Joh. Ambrosius Barth Verlag, Leipzig (1976)
95. NEELAKANTAPPA, K., GALLO, G. R., BALDWIN, D. S.: Proteinuria in IgA Nephropathy. Kidney Intern. 33 (1988), 716-721
96. NICOLSON, G. L. and PAINTER, R. G.: Anionic sites of human erythrocyte membranes. I. Effects of trypsin, phospholipase C, and pH on the topography of bound positively charged colloidal particles. J. Cell. Biol. 57 (1973a), 373-387
97. OBERHOLZER, M., OSTREICHER, M., CHRISTEN, H., BRÜHLMANN, M.: Methods in quantitative image analysis. Histochem. Cell. Biol. 105:5 (1996), 333-355
98. OP DEN KAMP, J. A. F.: Lipid asymmetry in membranes. Ann. Rev. Biochem. 48 (1979), 47-71
99. PSCHYREMBEL, Klinisches Wörterbuch. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 256. neu bearbeitete Auflage (1990)
100. PUSEY, C. D., DASH, A., KERSHAW, M. J., MORGAN, A., REILLY, A., REES, A. J., LOCKWOOD, C. M.: A single autoantigen in Goodpasture's syndrome identified by a monoclonal antibody to human glomerular basement membrane. Lab. Invest 56 (1987), 23-31
101. RAPOPORT, S. M.: Medizinische Biochemie - Lehrbuch für Studierende und Ärzte. 8. Auflage, Berlin, Volk und Gesundheit (1983)
102. RATHERT, P., PREISS, H.: Urinzytologie in der urologischen Praxis. Urologe, A (1982), 67-72
103. REMMELE, W. (Herausgeber), SCHUBERT, G. E.: Pathologie. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, Tokio Band III (1984), 65-81
104. RIEDE, U.-N., SCHAEFER, H.-E., WEHNER, H.: Allgemeine und spezielle Pathologie. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York (1989)

105. RISLER, T., PRZECHERA, M., MÜLLER, G. A., GRABENSEE, B., HERING, P., SCHOLLMEYER, P., ZÄUNER, I., STEIN, G., FRANZ, E. H., GRUPP, C.: Was ist gesichert in der Therapie der Glomerulonephritis?. *Der Internist* 32 (1991), 690-698
106. RIZZONI, G., BRAGGION, F., ZACCHELLO, G.: Evaluation of glomerular and nonglomerular hematuria by phase-contrast microscopy. *J. Pediatr.* 103 (1983), 370-374
107. ROMHANYI, G., DEAK, G.: On the ultrastructural organization of biological membranes as shown by topo-optical staining reactions. *Acta Morphol. Hung.* 17 (1969), 245-272
108. ROTH, St., RENNER, E., RATHERT, P.: Diagnostik der glomerulären Mikrohämaturie Studie zur praxisrelevanten Formstabilität und Färbbarkeit glomerulärer dysmorpher Erythrozyten. *Urologe B* 32 (1992), 71-76
109. ROTH, St., SEMJONOW, A., RATHERT, P.: *Klinische Urologie, Vom Befund zur Therapie.* Springer-Verlag Berlin, Heidelberg (1993)
110. SCHÄFFLER, A., BRAUN, J., RENZ, U.: *Klinikleitfaden Schwerpunkt Innere Medizin.* Jungjohann Verlagsgesellschaft Neckarsulm, Stuttgart, 4. erweiterte Auflage (1992)
111. SCHETTLER, G., GRETEN, H.: *Innere Medizin, Band I.* Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York, 8. neubearbeitete Auflage (1990)
112. SCHEVEN, Ch., STIBENZ, D.: Die Elastizität der Erythrocytenmembran: Übersicht und Versuch einer Deutung auf Grund neuerer Daten zur Ultrastruktur des Membranskelets. *Gegenbaurs morph. Jahrb. Leipzig* 129 (1983), 287-298
113. SCHEVEN, Ch., UNGER, H., RUMPEL, E., GEYER, G.: Formwandel und Verformbarkeit konservierter Erythrozyten. *Folia Haematol., Leipzig* 107 (1980), 89-103
114. SCHRAMEK, P., MORITSCH, A., HASCHKOWITZ, H., BINDER, B. R., MAIER, M.: In vitro generation of dysmorphic erythrocytes. *Kidney Int.* 36 (1989), 72-77
115. SCHRAMEK, P., SCHUSTER, F. X.: Persistierende Mikrohämaturie: Lokalisation der Blutungsquelle durch Beurteilung der Erythrozytenmorphologie. *Urologe (A)* 24 (1985), 216-220
116. SCHRAMEK, P., SCHUSTER, F. X., GEORGOPOULOS, M., PORPACZY, P., MAIER, M.: Value of urinary erythrocyte morphology in assessment of symptomless microhaematuria. *Lancet* 2 (1989), 1316-1319

117. SCHRAMEK, P., SCHUSTER, F. X., MORITSCH, A., MAIER, M.: Die Erythrozytenmorphologie bei asymptomatischer Mikrohämaturie: Experimentelle Untersuchungen und klinische Bedeutung. *Wien. Klin. Wochenschr.* 102 (1990), 635-640
118. SCHRIER, S. L., JUNGA, I., MA, L.: Endo- and exovesiculation and the structure of the human red cell membrane. *Clin. Med.* 108 (1986), 265-271
119. SCHUETZ, E., SCHAEFER, R. M., HEIDBREDER, E., HEIDLAND, A.: Effect of diuresis on urinary erythrocyte morphology in glomerulonephritis. *Klin. Wochenschr.* 63 (1985), 575-577
120. SCHULZ, F.-H., STOBBE, H.: Grundlagen und Klinik innerer Erkrankung, Teil I. Volk und Gesundheit Berlin, 4. überarbeitete Auflage (1982)
121. SCHUSTER, F. X., SCHRAMEK, P., SCHMIDBAUER, C. P.: Differenzierung glomerulärer und nichtglomerulärer Hämaturie im Hellfeldmikroskop. *Akt. Urol.* 16 (1985), 73-75
122. SCHWOCH, G. and PASSOW, H.: Preparation and properties of human erythrocyte ghosts. *Molec. Cell. Biochem.* 2 (1973), 197-218
123. SHICHIRI, M., OOWADA, A., NISHIO, Y., TOMITA, K., SHIIGAI, T.: USE of autoanalyser to examine urinary-red-cell morphology in the diagnosis of glomerular haematuria. *Lancet* (1986), 781-782
124. SIEGENTHALER, W.: Differentialdiagnose innerer Krankheiten. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 16. neubearbeitete Auflage (1988)
125. SIEGENTHALER, W.: Lehrbuch der Inneren Medizin. Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 3. Auflage (1992)
126. SPIRNAK, JP.: In: Resnick MI et al. (eds) Decision making in urology. Decker, New York, p. 4 (1985),
127. STECK, T. L.: The organisation of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell. Biol.* 62 (1974), 1-19
128. STEIN, G., RITZ, E.: Diagnostik und Differentialdiagnostik der Nierenerkrankungen. 1. Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena (1991)

129. STEIN, G., RITZ, E.: Diagnostik und Differentialdiagnostik der Nierenerkrankungen. 2.Auflage, Gustav Fischer Verlag Jena (1991)
130. STIBENZ, D.: Extraktion von Membranproteinen bei niedrigen Ionenstärken. Folia Haematol. 105 (1978), 109-116
131. STIBENZ, D.: Die Struktur der Erythrozytenmembran. Acta Histochem. Suppl 33 (1986), 99-106
132. STIBENZ, D., LINSS, W., MEYER, H. W., HALBHUBER, K.-J., GEYER, G.: Erythrocyte Vesiculation, 2. Membrane Molecular Transformation. Folia Haematol., Leipzig 108 (1981), 580-587
133. STIBENZ, D., HALBHUBER, K.-J., und LINSS, W.: Vesikulation von Erythrozyten. 4. Quantifizierung von Vesikulationsraten von Standardflüssigkonserven. Folia Haematol. (1981c)
134. STIBENZ, D., FEUERSTEIN, H., HALBHUBER, K.-J., und LINSS, W.: Vesikulation von Erythrozyten. 3. Bausteinanalyse der Vesikel der Blutkonserven. Folia Haematol. (1981b)
135. STIERLE, H. E., OSER, B., BOESKEN, W. H.: Improved classification of proteinuria by semiautomated ultrathin SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Clin. Nephrol. 33 (1987), 168-173
136. STRUTZ, F., BECKER, V., MÜLLER, G. A.: Interstitielle Beteiligung bei Glomerulonephritiden. Internist 37 (1996), 1143-1151
137. THIEL, G.: Mikroskopische Urinuntersuchung. Mitt. Klin. Nephrol. 14 (1985), 123-152
138. THIEL, G., BIELMANN, D., WEGMANN, W., BRUNNER, F. P.: Glomeruläre Erythrozyten im Urin: Erkennung und Bedeutung. Schweiz. med. Wschr. 116 (1986), 790-797
139. THOENES, W.: Pathologische Systematik der Glomerulonephritis unter Berücksichtigung klinischer Aspekte. Nieren- und Hochdruckkrankheiten 5 (1973), 199-208
140. TIEDT, N., ZWIENER, U.: Taschenbuch der Pathophysiologie. 2. Aufl., Verlag Volk und Gesundheit Berlin (1988)

141. TOMITA, M., KITAMOTO, Y., NAKAYAMA, M., SATO, T.: A new morphological classification of urinary erythrocytes for differential diagnosis of glomerular hematuria. Clin. Nephrol. 37 (1992), 84-89
142. TURNER, N., MASON, P. J., BROWN, R., FOX, M., POVEY, S., REES, A., PUSEY, C. D.: Molecular cloning of the human Goodpasture antigen demonstrates it to be the $\alpha 3$ chain of type IV collagen. J. Clin. Invest. 89 (1993), 592-601
143. WEBER, M.: Basement membrane proteins. Kidney Int. 41 (1992), 620-628
144. WEBER, M., MARX, M.: Autoantikörper in der Nephrologie. Internist (1995) 36, 270-276
145. WEBER, M., MEYER zum Büschenfelde, K.-H., KÖHLER, H.: Immunological properties of the human Goodpasture target antigen. Clin. Exp. Immunol. 74 (1988), 289-294
146. WEBER, M., PULLIG, O.: Different immunologic properties of the globular NC1 domain of collagen type IV isolated from various human basement membranes. Eur. J. Clin. Invest. 22 (1992), 138-146
147. WIESLANDER, J., BARR, J. F., BUTOWSKI, R. J., EDWARDS, S. J., BYGREN, P., HEINEGARD, D., HUDSON, B. J.: Goodpasture antigen of the glomerular basement membrane. Localization to noncollagenous regions of type IV collagen. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984), 3838-3842
148. WORTHINGTON, R. E., BOSSIE-CODREANU, J., van ZANT, G.: Quantitation of erythroid differentiation in vitro using a sensitive colorimetric assay for hemoglobin. Exp. Hematol. (1987), 85-92
149. ZIMMERMANN, N., PÄTZOLD, L., HALBHUBER, K.-J., LINSS, W.: Evidence for Erythrocyte-Microvesiculation In Vitro. Anat. Anz. Jena 158 (1985), 117-123

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Herr Prof. Dr. med. R. Fünfstück,
Herr Prof. Dr. med. K.-J. Halbhuber,
Dr. med. J. Tscharnke,
Dr. med. H. Oehring,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und daß Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

daß ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

daß ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Pößneck, 11.04.2001

Mirko Riedl

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Fünfstück ehemals Klinik Innere Medizin IV der Friedrich-Schiller-Universität Jena jetzt Sophien- und Hufeland-Klinikum gGmbH Weimar (Akademisches Lehrkrankenhaus der Universität Jena) sowie Herrn Prof. Dr. med. K.-J. Halbhuber aus dem Anatomischen Institut Jena danke ich herzlich für die Überlassung des Themas und Unterstützung während der Versuchsdurchführungen und Auswertung der Ergebnisse.

Ebenso danken möchte ich dem Chefarzt der Urologischen Klinik der Thüringen Klinik „Georgius Agricola“ gGmbH in Saalfeld Dr. med. J. Tscharnke, insbesondere für seine wertvollen Ratschläge und Unterstützung, welche mir unter anderem die Nutzung der vollständigen Laboreinrichtung der Thüringenklinik in Saalfeld ermöglichte.

Mein weiterer Dank gilt an dieser Stelle Herrn Dr. med. H. Oehring aus dem Anatomischen Institut Jena für die Anleitung an den technischen Geräten.

Ebenso danke ich Frau M. Eschler und Frau Günther aus dem Labor des Anatomischen Institutes Jena sowie Frau I. Lohr aus dem nephrologischen Labor der Klinik für Innere Medizin in Jena, die mir bei der Durchführung des praktischen Teils sehr behilflich waren.

Pößneck, 11.04.2001

Mirko Riedl

THESEN ZUR DISSERTATION

Untersuchungen zur Differenzierung der Erythrozyten bei Hämaturie glomerulärer und nichtglomerulärer Genese nach Färbung mit Diaminobenzidin

**vorgelegt
von
Mirko Riedl**

1. Im Rahmen der Differenzierung einer Hämaturie werden bei der mikroskopischen Untersuchung der Erythrozyten eumorphe und dysmorphe Zellformen unterschieden.
2. Im Urin von Patienten mit Glomerulonephritis sind dysmorphe Erythrozyten nachweisbar. Diese Zellen zeigen irreversible Membranveränderungen und sind durch einen reduzierten Hämoglobingehalt gekennzeichnet.
3. Bei Patienten mit einer nichtglomerulärer Hämaturie überwiegen im Urin Erythrozyten ohne Formveränderungen. Diese Zellformen werden auch als eumorphe Zellen bezeichnet.
4. Die Diaminobenzidin-Färbung (Pseudeperoxydase-Reaktion) von Erythrozyten im Urinsediment ermöglicht eine sehr gute Beurteilung dieser Zellen im Hellfeld-Mikroskop. Die Methode gestattet besonders präzise eine einfache Differenzierung eumorpher und dysmorpher Formen. Die typischen Merkmale dysmorpher Erythrozyten wie Membranfaltungen, Extrusionen, aber vor allem die Hämoglobinverarmung, sind durch diese Färbung besser als unter phasenkontrast-mikroskopischen Verhältnissen erkennbar.
5. Beträgt der Anteil dysmorpher Erythrozyten im Urin Δ 70 %, deutet dies auf eine manifeste glomeruläre Erkrankung hin. Ein Anteil von 20 % dysmorpher Zellen im Urin gibt bereits Hinweise auf eine möglicherweise beginnende glomeruläre und tubuläre Schädigung.
6. Mit einer computergestützten Auswertung von Erythrozyten aus dem Urin nach der Diaminobenzidin-Färbung ist es möglich, differenzierte Parameter wie den Durchmesser und die Mittlere Optische Dichte bei dysmorphen Zellen im Rahmen einer glomerulären Hämaturie und eumorphen Formen bei einer Hämaturie nichtglomerulärer Genese zu erfassen.

7. Die Durchmesser dysmorpher Erythrozyten sind deutlich geringer als die der eumorphen Formen. Die geringsten Zelldurchmesser besitzen dysmorphe Erythrozyten in Urinproben, in denen mehr als 70 % dysmorphe Zellen auf Grund einer glomerulären Ursache auftreten.
8. Nach der Diaminobenzidin-Reaktion ist möglich, die Mittlere Optische Dichte eines Erythrozyten als indirekten Parameter für den Hämoglobingehalt dieser Zelle computergestützt zu berechnen.
9. Dysmorphe Erythrozyten weisen im Vergleich zu eumorphen Zellen eine deutliche Hämoglobinverarmung auf.
10. Der Unterschied der Mittleren Optischen Dichten zwischen dysmorphen Erythrozyten aus dem Urin von Patienten mit Glomerulonephritis und eumorphen Zellen aus dem Urin bei nichtglomerulärer Hämaturie ist statistisch signifikant ($p < 0,05$).
11. Bei dysmorphen Erythrozyten besteht keine direkte Abhängigkeit zwischen Hämoglobinverarmung und Verringerung des Kreisdurchmessers.
12. Durch eine elektronenmikroskopische Untersuchung ist es möglich, stark hämoglobinverarmte Erythrozyten, welche als Schatten bezeichnet werden, morphologisch zu charakterisieren. Die Erythrozytenschatten besitzen einen besonders schmalen Randsaum, welcher auf eine ausgeprägte Schädigung der Zellen hindeutet. Sie werden bei der Betrachtung im Hellfeld- bzw. Phasenkontrastmikroskop auf Grund ihres schwachen Eigenkontrastes nur unzureichend wahrgenommen.
13. Membranausstülpungen der Erythrozyten werden als Knospen bezeichnet. Sowohl im Hellfeld-Mikroskop nach Diaminobenzidin-Färbung als auch im Elektronenmikroskop ist in diesen Bereichen ein stärkerer Kontrast sichtbar. Dies deutet auf eine erhöhte Konzentration von Hämoglobin im Inneren dieser Zellabschnitte hin.
14. Über die Ursache der Entstehung glomerulärer dysmorpher Erythrozyten existieren unterschiedliche Vorstellungen. Es ist zu vermuten, daß die Bildung dysmorpher Formen in einer Kombination von Schädigungsmechanismen zu sehen ist, wobei bereits intrarenale Veränderungen an den Zellen auftreten. Alleiniger Urinkontakt von Erythrozyten bewirkt im Rahmen der Dysmorphogenese keinen Hämoglobinverlust.
15. Zum gegenwärtigen Zeitpunkt besitzt die Beurteilung von Erythrozyten aus dem Urin nach der Diaminobenzidin-Färbung Studiencharakter. Für die Diagnostik in der klinischen Praxis ist die Beurteilung des Urinsediments im Phasen-Kontrast-Mikroskop trotz optischer Einschränkungen zur Zeit die Methode der Wahl.

LEBENS LAUF

Riedl, Mirko

Geburtsdatum: 07.04.1968
Geburtsort: Saalfeld/Saale

Schulbildung

09/74 – 08/84	Allgemeinbildende Oberschule Krölpa
09/84 – 08/86	Erweiterte Oberschule Pößneck
1986	Abitur
09/86 – 10/86	Praktikum im Kreiskrankenhaus Pößneck
10/86 – 09/89	Armeedienstzeit bei der Bereitschaftspolizei Rudolstadt

Studium

10/89 – 09/94	Studium der Humanmedizin an der Universität Leipzig
10/94 – 05/95	Praktisches Jahr in den Fachbereichen Chirurgie, Urologie, Pädiatrie in der Thüringen-Klinik „Georgius Agricola“ Saalfeld/Saale
05/95 – 09/95	Praktisches Jahr im Fachbereich Innere Medizin an der Klinik für Innere Medizin der Friedrich-Schiller-Universität Jena
09/95	3. Staatsexamen Universität Leipzig

Berufliche Tätigkeit

09/95 – 03/97	Arzt im Praktikum an der Thüringen-Klinik „Georgius Agricola“ Saalfeld/Saale
seit 04/97	Assistenzarzt der Urologischen Klinik der Thüringen-Klinik „Georgius Agricola“ Saalfeld/Saale

Pößneck, 11.04.2001

